

300627

49
2EJ



UNIVERSIDAD LA SALLE, A.C.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

EFECTO DE L-ARGININA Y POLIAMINAS SOBRE LA
AGREGACION PLAQUETARIA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

EDUARDO ZARZOZA BARRERA

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**ESTE TRABAJO EXPERIMENTAL SE REALIZO EN LA UNIDAD DE
INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES METABOLICAS DEL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MEDICO NACIONAL S. XXI,
IMSS.**

**Agradezco el apoyo del Laboratorio de Coagulación bajo la dirección de la QFB María de la Paz
Reyna por su interés en este proyecto.**

A Dios, por haberme dado el don de vivir,
por concederme la gracia de una familia,
por los éxitos y fracasos que sin ellos no
hubiera logrado las metas obtenidas.

*"Señor, si he hecho bien, Tú lo sabes,
si mal, me acojo a tu misericordia."*

A Estela, mi madre, por haberme
siempre llevado de la mano por el
buen camino y por ayudarme a
enfrentar la vida con valentía.

A Fernando, mi padre, por enseñarme
que a través de la constancia y esfuerzo
se logran todas las metas, así como por
todos sus consejos de padre y amigo.

*"Por la gracia de haberme traído al mundo
y la virtud de tenerlos a mi lado; por su
amor y comprensión, apoyo, esfuerzos y
sacrificios; por sus valiosas enseñanzas y
consejos, por darme una educación y por
todo lo que implica ser Padre y Madre."*

**A mi hermano Fernando quien
me ha servido como ejemplo en
la vida, en la salud y enfermedad
y por estar siempre juntos.**

**A Leopoldo' y Lucha, mis abuelos,
por sus cuidados y atenciones que
siempre me han brindado y por ser
un ejemplo a seguir.**

Al Instituto "Don Bosco", por acogerme en sus aulas por tantos años; por brindarme una formación básica y cristiana y porque eres mi esperanza, recuerdo de lo sido, anhelo del saber.

"Hodie labor, cras fructus"

A la Escuela de Ciencias Químicas de la "Universidad La Salle" por su formación profesional y humana para el servicio de la sociedad.

"Indivisa manent"

A todos mis amigos y compañeros de licenciatura con quienes compartí una de las mejores etapas de la vida, tanto en las buenas como en las malas.

A Isabel Monteón, Mara Zepeda, Vania Nava, Verónica Vega y Lilitiana Torres por ser las mejores amigas y por permitirme aprender de ustedes.

***"Que los caminos se despejen ante ustedes,
que el viento sople siempre a sus espaldas,
que el sol los envuelva tibiamente,
que suaves lluvias riegan sus campos
y hasta que nos volvamos a encontrar que
Dios los guarde en la palma de su mano"***

Bendición indígena mexicana

A Silvia, Rosario y Manuel del Laboratorio de Coagulación del Hospital de Especialidades, CMN S.XXI, IMSS, por su gran interés y empeño en este trabajo y por sus enseñanzas, así como por los grandes momentos compartidos.

A Mary Paz Reyna, ex-jefa del Laboratorio de Coagulación, por su confianza personal e interés, así como por compartir sus conocimientos, consejos y gratos momentos durante el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. José D. Méndez, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado y confiar en mí. Por sus enormes consejos como investigador, profesor y sobre todo como amigo, así como por todos los grandes momentos compartidos.

"La búsqueda de la verdad es, por un lado, difícil y, por otra parte, fácil, pues es evidente que nadie puede dominarla totalmente ni tampoco ignorarla por completo pero cada cual contribuye un tanto a nuestro conocimiento de la Naturaleza y de todos los hechos, así reunidos surge una cierta grandiosidad"

Aristóteles

	Pag.
INDICE GENERAL	
RESUMEN	
INTRODUCCION	
OBJETIVO	
I. GENERALIDADES	1
MORFOLOGIA PLAQUETARIA	
Zona periférica	2
Capa exterior	2
Unidad de membrana	3
Región submembranal	4
Zona sol-gel	4
Microtúbulos	4
Microfilamentos	5
Zona de organelos	5
Gránulos	5
Mitocondria	7
Sistema de membrana	7
Sistema canalicular conectado a la superficie (OCS)	7
Sistema tubular denso (DTS)	8
COMPOSICION Y BIOQUIMICA PLAQUETARIA	
Carbohidratos	9
Proteínas	12
Proteínas estructurales (del citoesqueleto)	12
Proteínas almacenadas en los gránulos	13
Glicoproteínas	13
Enzimas	13
Aminoácidos y péptidos	14
Nucleótidos	16
Minerales y vitaminas	16
Serotonina	17
Componentes de membrana	17
Lípidos	17
Glicoproteínas y receptores	18

FUNCION PLAQUETARIA. LA HEMOSTASIA

Factores vasculares	19
Factores plaquetarios	20
Adhesión	21
Activación	22
Agregación	24
Secreción	25
Factores plasmáticos	28
Actividad procoagulante	29
Contracción del coágulo	29
Coagulación plasmática	30
Ruta intrínseca	30
Ruta extrínseca	30
Formación de la trombina	31
Formación de la fibrina	31
Fibrinólisis	31

II. AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Agregación plaquetaria	32
Mecanismo de acción	32
Agonistas de la agregación plaquetaria	33
ADP	34
Epinefrina	35
Trombina	35
Colágena	36
Ristocetina	36
Fibrinógeno	37
Otros inductores	37
Antagonista o inhibidores de la agregación plaquetaria	38

III. ANORMALIDADES PLAQUETARIAS EN DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus	42
Clasificación	43
Diabetes experimental	45
Anormalidades hematológicas en Diabetes mellitus	47
Anormalidades plaquetarias en Diabetes mellitus	49
Insulina	56
L-arginina	58
Arginasa	60
Poliaminas	62

IV. MATERIAL Y METODO	66
V. RESULTADOS Y DISCUSION	68
VI. CONCLUSIONES	75
APENDICE	76
BIBLIOGRAFIA	81

RESUMEN

Se estudió *in vitro* el efecto antiagregante de L-arginina y poliaminas en plaquetas de ratas normales y con diabetes inducida (aloxana 120 mg/Kg, i.p.). En ambos grupos, este efecto fue comparado con el de la insulina. Se determinaron las concentraciones de glucosa, triglicéridos, lípidos y proteínas totales y la actividad de arginasa (de 125 ± 2.6 a 543 ± 16.9 mg/dl, de 62.0 ± 8.2 a 823.0 ± 6.1 mg/dl, de 261.8 ± 19.6 a 1134.7 ± 30.3 mg/dl, de 1.758 ± 0.110 a 2.256 ± 0.138 mg/10⁶ plaquetas y, de 0.116 ± 0.024 a 0.078 ± 0.006 nmoles urea/mg proteína/minuto, respectivamente).

La administración de aloxana produjo cambios marcados en las concentraciones de glucosa, triglicéridos y lípidos totales, indicativos de daño pancreático.

Las pruebas de agregación plaquetaria se realizaron utilizando plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de ambos grupos de animales. Como inductores se utilizaron ADP ($2.5 \mu\text{M}/\text{ml}$), epinefrina ($250 \mu\text{M}/\text{ml}$) y trombina ($0.4 \text{U}/\text{ml}$). La L-arginina y las poliaminas produjeron una agregación no mayor del 40% en plasma de rata normal, mientras que en plasma de rata diabética el porcentaje de agregación no fue mayor del 50% cuando se utilizó trombina. Estos resultados obtenidos demuestran que la L-arginina y las poliaminas son excelentes antagonistas de la agregación plaquetaria.

La actividad de arginasa fue demostrada en las plaquetas. Esta actividad fue menor cuando se indujo diabetes (de 0.1163 ± 0.024 a 0.0783 ± 0.006 nmoles urea/mg proteína/minuto). La actividad de esta enzima puede estar asociada con la biosíntesis de poliaminas.

INTRODUCCION

La sangre es un tejido compuesto de células diferenciadas o elementos figurados (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) suspendidas en un fluido conocido como plasma y químicamente está compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas.

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplasmáticos sin núcleo, metabólicamente activos y derivan de los megacariocitos de la médula ósea. Circulan como discos biconvexos de 2 a 4 μm y se encuentran en una proporción de entre 200 y 400 mil plaquetas/ml.

Para su estudio la plaqueta se divide en cuatro regiones distintas, cada una de ellas con una función específica: 1) zona periférica; 2) zona sol-gel; 3) zona de organelos y, 4) zona de membrana. A su vez, cada una de estas regiones presenta estructuras de función también específica.

Como en otras células, las plaquetas están formadas, en gran parte, de los componentes celulares, excepto de DNA. La energía la obtienen a partir de ATP, el cual se genera de la degradación de glucosa, de los ácidos grasos, de los aminoácidos plasmáticos y del glucógeno plaquetario.

Las plaquetas tienen como función principal detener el flujo sanguíneo producido por un traumatismo mediante la formación de un coágulo hemostático en un proceso conocido como hemostasia, la cual involucra tres factores interrelacionados (vasculares, plaquetarios y plasmáticos) y dos etapas (hemostasia primaria y hemostasia secundaria).

La agregación plaquetaria es una de las funciones principales de la hemostasia y es quien controla el sangrado cuando existe una lesión interna o externa. *In vitro*, para que se lleve a cabo la agregación es necesario la presencia de agentes agonistas o inductores como ADP, trombina o colágena.

La diabetes es una enfermedad crónica y generalizada asociada con alteraciones de carbohidratos, grasas y proteínas, manifestándose con hiperglucemia, glucosuria, aumento en la degradación de proteínas, cetosis, acidosis y aumento en las enfermedades vasculares y coronarias y su causa se debe a la deficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina.

La diabetes también produce una serie de cambios hematológicos, destacando los cambios morfológicos y funcionales en los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como cambios en la viscosidad plasmática y sanguínea.

En diabetes las plaquetas presentan anomalías en su función debido a una hiperactividad plaquetaria involucrada con factores patogénicos de las complicaciones vasculares como: aumento en el número de algunos receptores, disminución en la fluidez de la membrana, glicación del complejo glicoprotéico IIb/IIIa, disminución de los niveles de AMPc, incremento en los procesos de adhesión, activación, agregación y liberación, así como una disminución en la actividad fibrinolítica.

Varias sustancias como la heparina, el ácido acetilsalicílico y otros anti-inflamatorios no esteroideos han sido probadas como inhibidores de la agregación plaquetaria. En este estudio se presentan los resultados que se han obtenido con L-arginina y poliaminas comparándose con aquellos de insulina.

OBJETIVO:

Estudiar el efecto de L-arginina y poliaminas sobre la agregación de plaquetas aisladas de ratas normales y diabéticas y comparar este efecto con el de la insulina..

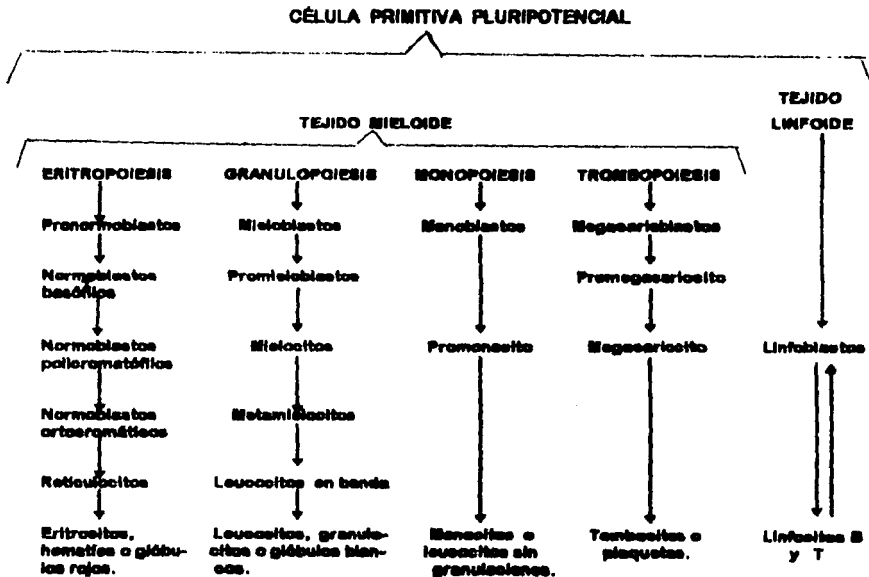
GENERALIDADES

GENERALIDADES

La sangre como tejido es una suspensión de células diferenciadas producidas por las células hematopoiéticas no diferenciadas de la médula ósea y del sistema fagocítico mononuclear. Químicamente, está compuesta de sustancias orgánicas (proteínas, aminoácidos, enzimas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos y gases en disolución) e inorgánicas (agua y electrolitos como Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^- y SO_4^-)¹.

La sangre circulante está formada de elementos configurados (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) suspendidos en un fluido conocido como plasma, el cual es altamente complejo.

El sistema hematopoiético es el conjunto de órganos y tejidos que dan origen a las células sanguíneas^{1a}.



GENERALIDADES

agregación plaquetaria. La glicoproteína I, GPI, es necesaria para la adhesión; las glicoproteínas II y III son necesarias para la agregación normal. Las glicoproteínas superficiales contienen moléculas de ácido siálico, lo que proporciona una superficie de carga negativa que, por repulsión electrostática, evita que las plaquetas se adhieran unas a otras o al endotelio normal², debido al grupo carboxilo del ácido siálico y a los residuos ácidos de los aminoácidos de las sialoglicoproteínas³.

La capa exterior es el sitio de adhesión plaquetaria y permanece antes, durante y después de la agregación.

Unidad de membrana

La unidad de membrana es una estructura trilaminar que determina las propiedades de permeabilidad, por lo que es esencial para la integridad de la plaqueta. Es muy sensible a agentes tales como antihistamínicos, anestésicos locales, agentes quelantes, sales en altas o bajas concentraciones y agentes surfactantes los cuales pueden producir daños a la membrana y a la plaqueta. Los cambios se caracterizan por la alteración en el contorno superficial o por un incremento en la permeabilidad, produciendo hinchazón en la plaqueta⁴.

La unidad de membrana está integrada de una bicapa fosfolipídica con proteínas transmembranales dispuestas al azar. Las moléculas de fosfolípidos, las cuales están distribuidas asimétricamente sobre los dos lados de la bicapa, son capaces de difundirse lateralmente o llegan a estar translocadas de un lado a otro (fenómeno llamado flip-flop).

Los fosfolípidos neutros (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) están concentrados en la superficie externa, mientras que los fosfolípidos anfipáticos (fosfatidilserina y fosfatidilinositol) se localizan sobre la capa interna. Las moléculas de colesterol, localizadas entre las moléculas de fosfolípidos, están solubilizadas por éstas^{4,5}.

Las glicoproteínas integrales embebidas en la superficie de la membrana están enumeradas del I al IX de acuerdo a su migración electroforética. Son 6 principales glicoproteínas, GPI a GPV, las cuales poseen funciones enzimáticas, receptoras o transportadoras⁴.

Otros importante componentes de la unidad de membrana incluyen a las endoenzimas membranales las cuales están involucradas en el transporte a través de membrana y en el metabolismo de AMP cíclico².

Región submembranal.

Constituye el espacio entre la unidad de membrana y la banda circunferencial de los microtúbulos y contiene un sistema de elementos filamentosos compuestos de actina y miosina (proteínas insertadas en la parte interna de la membrana plaquetaria)^{3,5}. Estos filamentos son responsables para los cambios de forma producidos por agonistas como el ADP, colágena y epinefrina y permiten a la plaqueta a responder a señales direccionales por la prolongación de pseudópodos.

La trombina incrementa la cantidad de filamentos de actina. La F-actina, la miosina, los receptores de la membrana plasmática para las GPIIb/IIIa, el factor V y el fibrinógeno, están unidos al exterior del citoesqueleto de actina⁶.

La región submembranal representa una región de transición entre la zona periférica y la zona sol-gel del hialoplasma.

II ZONA SOL-GEL

La zona sol-gel comprende la matriz viscosa interna de las plaquetas; integrada de proteínas ensambladas en los elementos fibrosos, esta zona está constituida de 3 sistemas fibrosos, los cuales difieren sólo en su estado de polimerización, agregación y localización celular^{3,9}:

- Filamentos submembranales.
- Microtúbulos.
- Microfilamentos.

Microtúbulos

Los microtúbulos constituyen el sistema citoesquelético plaquetario localizado en el plano ecuatorial por debajo de la pared celular; están compuestos de tubulina polimerizada en un solo tubo pequeño de aproximadamente 25 nm de diámetro y enrollada para formar una estructura cilíndrica compuesta de 10-24 subfilamentos paralelos entre sí^{3,9}.

La característica principal de los microtúbulos es la de mantener la forma discoide y dar motilidad a la plaqueta, dándole plasticidad y conformación. El movimiento centripeto, las secreciones subsecuentes de los gránulos, la contracción de pseudópodos y la retracción del coágulo, esencial para el funcionamiento normal de la plaqueta, depende de los elementos fibrosos de la zona sol-gel^{4a}. Por esta razón se considera esa zona una división morfológica separada, relacionada con la función contráctil.

Debido a que los microtúbulos no se puedan contraer, la fuerza contráctil es proporcionada por los microfilamentos.

Microfilamentos

Desde el punto de vista funcional, los microfilamentos se consideran elementos esenciales del mecanismo contráctil. Se encuentran en los pseudópodos y forman una extensa red en la plaqueta⁹.

Los microfilamentos están compuestos de actina y miosina, de proteínas contráctiles similares a las que se encuentran en el músculo liso¹⁰.

III ZONA DE ORGANELOS

La zona de organelos se encuentra por debajo de los microtúbulos, amebidos en el citoplasma plaquetario. su distribución es al azar cuando la plaqueta no está activada pero se centran cuando se lleva a cabo la activación. Esta zona está constituida por gránulos, mitocondrias y partículas de glucógeno.

Gránulos

Los gránulos plaquetarios tienen la característica de ser numerosos y son fuente importante de sustancias secretadas por las plaquetas. Sirven como sitio de almacenamiento de proteínas y de otras sustancias esenciales para la función plaquetaria. Son redondos y están encerrados en una unidad de membrana^{4a}. De acuerdo a su opacidad electrónica, los gránulos se clasifican en 2 grupos:

- Gránulos no densos.
 - Gránulos α o gránulos verdaderos.
 - Gránulos λ o gránulos lisosomales.
 - Gránulos peroxisomales.
- Gránulos densos.
 - Gránulos δ o lisosomas.

La composición de cada uno de los gránulos se presenta en la tabla 1.

Los gránulos α son los más numerosos y son sitios de almacenamiento de proteínas. Estas proteínas se clasifican en dos grupos: uno, proteínas similares a aquellas que participan en la coagulación; el otro, proteínas específicas de las plaquetas (Tabla 1). Todas las proteínas de los gránulos α son secretadas cuando las plaquetas son estimuladas con muchos agonistas^{4a,5,11}. Se piensa que los gránulos α son lisosomas.

Los gránulos λ se encuentran en el lisosoma y contienen enzimas hidrolíticas o lisosomales (hidrolasas ácidas, arilsulfatasas, catepsinas y β -glucuronidasas) cuya función es la de degradar sustancias en los lisosomas secundarios y eliminar los desechos plaquetarios durante el proceso de curación de las heridas. Muchas de estas enzimas son secretadas por fuertes estímulos y están presentes en membranas de origen superficial o intracelular. Los gránulos λ no tienen ribosomas^{4a}. Los peroxisomas contienen únicamente catalasa.

Tabla 1. Clasificación y contenido de los gránulos plaquetarios.

Gránulos α o verdaderos	Gránulos λ o lisosomales	Gránulos δ o siderosomas	Proteínas granulares de localización desconocida
<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas específicas de la plaqueta (de bajo peso molecular): Factor plaquetario 4 (PF-4). β-tromboglobulina (β-TG). Proteína básica - Factor mitogénico. Factor bactericida. Factor de permeabilidad vascular. Factor quimiotáctico. - Factores de coagulación: Factor V Factor VIII - Glicoproteínas (de alto peso molecular): Trombospondina (prot. sensible a la trombina). Fibrinectina Albumina. - Otras proteínas: Inmunoglobulina G (IgG). Osteonectina. 	<ul style="list-style-type: none"> β-N-Hexosamina Fosfatasa ácida β-Glucuronidasa. α y β Galactosidasa α y β Fructosidasa α-Arabinosidasa β-Glicerofosfatasa α-Aрил-sulfatasa. Catepsinas.. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aniones: ATP. ADP GTP GDP. Ortofosfato. Pirofosfato - Cationes: Calcio. Serotonina 	<ul style="list-style-type: none"> Endoglucosidasa Colagenasa. 5'-5' Fosfodiesterasa Proelastasa y elastasa α-Macroglobulina.

Los gránulos δ , siderosomas o cuerpos densos son electrónicamente más opacos debido a su contenido de calcio y pirofosfato, además de ADP, ATP y serotonina^{4,11}. Su tamaño es de aproximadamente 55 Å de diámetro y contienen, además, partículas de ferritina (por contener hierro).

Durante la transformación interna que ocurre después de la exposición a agentes de agregación, los cuerpos densos se mueven hacia el centro del citoplasma. La transformación de los gránulos en cuerpos densos está relacionada a la liberación de serotonina^{4a}.

El ADP de los cuerpos densos se conoce como la reserva no metabólica del ADP para distinguirlo del ADP metabólico citoplasmático⁴.

Mitochondria

La mitocondria plaquetaria es más simple en estructura y menor en número. Participa en el depósito metabólico de ATP bloqueando la glucólisis aeróbica sin afectar los niveles de ATP plaquetario o las funciones celulares que requieren energía⁴.

La mitocondria plaquetaria llega a ser más opaca a los electrones durante la metamorfosis viscosa y desarrolla precipitados similares a los depósitos de metales pesados. Además de su actividad metabólica, la mitocondria puede funcionar como depósito de calcio similar a la de la mitocondria del músculo liso. La mitocondria es fácil de identificarla por sus características de doble membrana².

Las partículas de glucógeno se encuentran en masas relativamente grandes y son la forma de almacenamiento de la glucosa.

Existen, además, once gránulos que son más densos y más grandes que los anteriores llamados gránulos muy densos (very dense granule, VDG). El contenido de estos gránulos rodeados de membrana tienen una posición más o menos excéntrica, dejando un espacio ancho que parece vacío.

IV SISTEMAS DE MEMBRANA

Constituyen la cuarta zona estructural plaquetaria y está integrada por dos sistemas, el sistema canalicular abierto a la superficie y el sistema tubular denso. Estos dos sistemas se fusionan al citoplasma para formar complejos de membrana que son importantes reguladores en las concentraciones de calcio intracelular que a su vez regula el metabolismo plaquetario y la activación.

Sistema canalicular conectado a la superficie

El sistema canalicular consiste de complicadas invaginaciones de la pared celular (superficie de la membrana), en el interior de la plaqueta, a través del citoplasma, en forma de serpiente. Las canaliculas incrementan el área superficial total de las plaquetas expuestas al plasma y proporcionan una ruta para las sustancias químicas y partículas para alcanzar los huecos más profundo de la célula. Sirven como conductos para transportar las sustancias secretadas por gránulos plaquetarios^{3,4}.

Las membranas canaliculares están dotadas de microfilamentos ordenados en forma circular y longitudinal, los cuales constituyen parte del citoesqueleto de la plaqueta⁴.

Durante la agregación y liberación, estos filamentos parecen unir diferentes componentes del sistema.

Las observaciones de que el sistema canalicular permanecen durante todo el proceso de cambio de forma, transformación interna, contracción, adhesión y agregación, sugieren que los canales pueden servir como conductos para las sustancias expulsadas por la plaqueta durante la reacción de liberación⁴⁴.

Las vesículas y vacuolas están ausentes en las plaquetas ya que en realidad son componentes del sistema canalicular.

Sistema tubular denso

Este sistema se origina a partir del retículo endoplásmico rugoso de los megacariocitos y sirve como sitio de almacenaje para los iones calcio⁴⁶. Está constituido de una red de canáliculas estrechas localizadas en el interior de los microtúbulos, pero también está disperso entre otros elementos del citoplasma.

Este organelo se caracteriza por contener una isoenzima de peroxidasa, considerada como específica de la plaqueta⁴⁴. Un inhibidor de esta enzima, el 3-amino-1,2,4-triazol, tiene efectos sobre la agregación plaquetaria, similares a los que produce la aspirina, bloqueando la síntesis de prostaglandinas y la segunda onda de agregación inducida por agentes agonistas como ADP o colágena.

FALLA DE ORIGEN

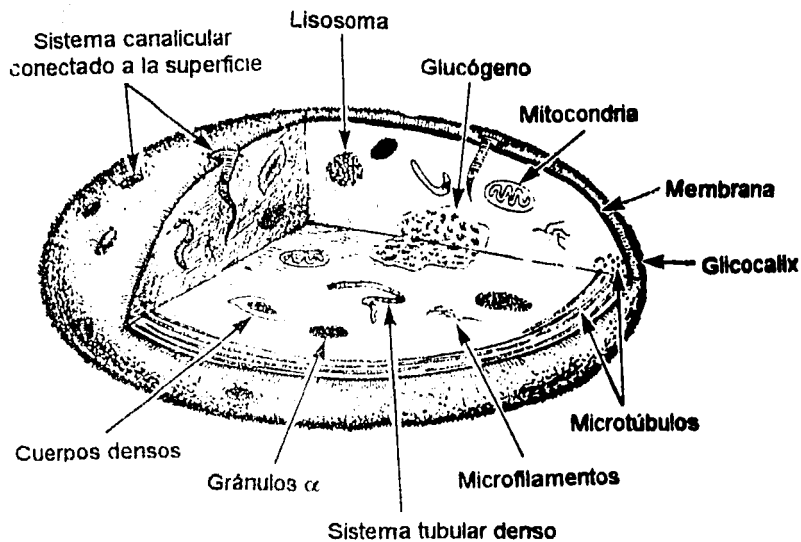


Figura 1. Características ultraestructurales de la plaqueta. El glicocalix y la membrana integran la zona periférica; la zona sol-gel incluye microfilamentos y microtúbulos asociados mientras que los cuerpos densos, los gránulos α , los lisosomas, los gránulos de glucógeno y la mitocondria están embebidos en una matriz citoplasmática. El sistema tubular denso y el sistema canalicular conectado a la superficie son componentes de los sistemas membranales⁶.

FALLA DE ORIGEN

COMPOSICION Y BIOQUIMICA PLAQUETARIA

Las plaquetas son una población heterogénea de fragmentos citoplasmáticos cuyo volumen oscila entre 5 y 12 μm^3 y están formadas en gran parte, de los componentes celulares, excepto de DNA. El glucógeno, el nucleótido de adenina, proteínas, aminoácidos entre otros, se encuentran distribuidos de forma heterogénea en las plaquetas. Si se llegara a ocupar la población total plaquetaria, habría 140 mg. de proteína o 0.78×10^{11} plaquetas por gramo de tejido húmedo o por ml. de plaquetas concentradas^{4,4a}.

Las plaquetas no utilizan energía para sintetizar macromoléculas debido a que su metabolismo es necesario para mantener a las plaquetas no estimuladas, y para dirigir la respuesta hemostática en plaquetas estimuladas.

Las plaquetas realizan una serie de procesos bioquímicos que se realizan en el momento de su estimulación; estos procesos incluyen glucólisis y gluconeogénesis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, translocación de calcio, fosforilación de proteínas, liberación de araquidonato, etc. La inhibición de la respuesta plaquetaria está asociada con la estimulación de otros procesos bioquímicos que no intervienen en plaquetas estimuladas¹⁶.

16a.

PRODUCCION DE ENERGIA

Cuando las plaquetas no son estimuladas utilizan energía a partir de ATP, el cual se origina, a su vez, de la degradación de la glucosa, de los ácidos grasos, de los aminoácidos del plasma y del glucógeno plaquetario. En plaquetas estimuladas, la producción de ATP se ve incrementada por la glucólisis, gluconeogénesis y la fosforilación oxidativa.

La estimulación plaquetaria activa una cascada de transducción de señales que requieren de una gran cantidad de ATP para mantener los niveles de GTP y la fosforilación del 1,2-diacilglicerol y proteínas.

CARBOHIDRATOS

En plaquetas, el contenido de carbohidratos es de 25 mg/10¹¹ plaquetas o 1.9% del peso húmedo. Los carbohidratos plaquetarios están compuestos de poli- y heterosacáridos. El glucógeno constituye el 40% de carbohidrato total y se encuentra en forma particulada. La hexosamina plaquetaria está distribuida en un 75% en glicoproteínas y 25% en glicosaminoglicano. La glucosamina es la principal hexosamina, componente de la

glicoproteína plaquetaria, mientras que la galactosamina constituye el 96% de los aminoazúcares de los glucosaminoglicanos (Tabla 2).

Tabla 2. Carbohidratos plaquetarios.

	mg/g	µmoles/g
Carbohidratos.	19.40	--
Glucógeno.	5.38	31.10
Otras hexosas*.	10.10	--
Pentosas*.	1.46	--
Galactosamina.	5.83	33.10
Acido siálico.	1.80	5.98
Acido urónico.	0.35	1.78
Glucosamina.	0.23	1.29
Acido láctico.	0.176	1.95
Acido pirúvico.	0.018	0.209
Glucosa -6-fosfato	0.018	0.070
Glucosa-1,6-difosfato.	0.032	0.089
α-Glicerofosfato.	0.033	0.194

* Carbohidratos monoméricos presentes: galactosa, manosa, fucosa, ribosa, ácido glucorónico^{12a}.

Las plaquetas son ricas en glucosidasas ácidas y arilsulfatasas, enzimas necesarias para el metabolismo de glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Diversas glicosiltransferasas se encuentran en el citoplasma plaquetario y se cree que participan en el metabolismo de glicoproteínas.

El ácido siálico plaquetario está constituido de ácido N-acetilneuramínico. El tratamiento de las plaquetas intactas mediante neuraminidasa libera el 60% del ácido siálico total, lo que sugiere que no todo el ácido siálico está disponible para la acción enzimática, o no se encuentra en la superficie plaquetaria. La estructura de los grupos sial en las glicoproteínas plaquetarias parece estar controlada por sialil-transferasas específicas^{12a}.

Las plaquetas presentan un metabolismo de carbohidratos activos y contienen las enzimas de los ciclos de Embden-Meyerhof, fosfatos de pentosa, glucolíticas y gluconeogénicas y, del ciclo de Krebs; además, necesitan un aporte constante de ATP. La agregación plaquetaria coincide con la estimulación de los fosfatos de pentosa, seguida de un aumento en la actividad del ciclo de Krebs.

In vitro, la glucólisis y gluconeogénesis son dos rutas metabólicas presentes en las plaquetas. Su flujo depende del oxígeno y de la glucosa extracelular disponibles.

La glucólisis anaeróbica implica la degradación de la glucosa-6-fosfato a lactato. La glucosa-6-fosfato se origina en las plaquetas por dos mecanismos: 1) fosforilación por hexocinasa de glucosa transportada a través de membrana o, 2) conversión de la glucosa-1-fosfato a partir del glucógeno.

Las plaquetas transportan glucosa por un mecanismo por el cual también transportan otros azúcares como fructosa, manosa, galactosa, ribosa y arabinosa.

Toda la glucosa que entra a las plaquetas es fosforilada a glucosa-6-fosfato por ATP y hexocinasa. Su conversión en lactato involucra 10 reacciones catalizadas por enzimas específicas¹⁶.

La glucosa-6-fosfato también es metabolizada por la vía de fosfatos de pentosa. Esta ruta produce CO_2 y NADPH y mantiene al glutatión en forma reducida.

El glucógeno es el principal polisacárido plaquetario, el cual contiene la enzima reguladora para su formación, la glucógeno sintetasa¹⁷.

Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato originado de la glucólisis es oxidado a CO_2 y H_2O en la mitocondria plaquetaria por el ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs, ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbóxicos consiste en una serie de reacciones que oxidan el grupo acetilo de la acetil CoA a dos moléculas de CO_2 mediante la presencia de 8 enzimas y con la formación de tres moléculas de NADH y FADH_2 y una molécula de GTP para conservar la energía libre y generar ATP.

En el transporte electrónico, la energía libre de la transferencia de electrones de NADH y FADH_2 a O_2 está acoplada a la síntesis de ATP.

En la fosforilación oxidativa, la síntesis endógena de ATP a partir de ADP y Pi en la mitocondria, es catalizada por la ATP sintasa la cual es dirigida por el transporte electrónico. Al final de todo el proceso habrá una liberación de 38 moléculas de ATP.

PROTEINAS

Las proteínas son el principal componente de las plaquetas y representan el 24% del peso húmedo o 180 mg/10¹¹ células. De acuerdo a su función y localización subcelular, las proteínas plaquetarias se subdividen en:

- Proteínas estructurales (del citoesqueleto).
- Proteínas almacenadas en los gránulos (secretables).
- Glicoproteínas.
- Enzimas.

Proteínas estructurales (del citoesqueleto)

Las plaquetas fueron las primeras estructuras no musculares que presentaron proteínas contráctiles como es la actinomicosina (trombostenina).

La actina es la proteína más abundante en las plaquetas; es un polipéptido que forma una doble hélice, que polimeriza a actina F, la cual contiene una mol de ADP por monómero de actina y estimula la actividad ATPasa de la miosina.

La actina se encuentra en dos formas diferentes en la plaqueta: isozimas β y γ . Además, la actina se puede encontrar en varios niveles de organización: en plaquetas activadas se presentan microfilamentos de actina F. La actina G puede polimerizar a actina FA.

Existen dos proteínas que forman complejos con la actina G, la gelsolina, dependiente de iones calcio, y la profilina, que interactúa con la actina G. Existen proteínas cuya función es la de anclar a la actina a la membrana, es el caso de la filimina.

La miosina es una proteína compuesta de 6 cadenas polipeptídicas organizadas en 3 pares idénticos; 2 cadenas son denominadas cadenas pesadas teniendo un dominio globular (cabeza), y un dominio alargado (cola). Los otros dos pares son polipéptidos más pequeños denominados cadenas ligeras. Cada una de las cabezas tiene un sitio de unión para la actina F y sitio enzimático para la hidrólisis de ATP a ADP y Pi, estimulado por Mg^{2+} o Ca^{2+} .

La miosina está presente en el citoesqueleto plaquetario e incrementa durante el cambio de forma inducido por el frío o por los diferentes agentes agonistas.

Los microtúbulos están constituidos de tubulina polimerizada, proteína de alto peso molecular, denominadas proteínas accesorias de los microtúbulos. La tubulina está unida a la membrana plasmática de la plaqueta y su función es mantener la forma discoide de éstas^{12,13}.

Proteínas almacenadas en los gránulos

Todas las proteínas de los gránulos α son secretadas cuando las plaquetas son estimuladas por muchos agentes agonistas. En la tabla 1 se presenta el contenido de cada uno de los gránulos plaquetarios (Tabla 1).

Existen proteínas específicas de las plaquetas como el factor plaquetario 4 (PF-4 o antiheparínico) que forma complejos con los glicosaminoglicanos y tiene alta afinidad por la heparina; la β -tromboglobulina (β -TG), de baja afinidad a la heparina y la proteína básica.

Los gránulos α también contienen los factores de coagulación como es el fibrinógeno, el factor V o el factor VIII, siendo el primero la principal proteína plaquetaria.

La presencia de proteínas catiónicas del extracto ácido de los gránulos α proporciona actividades fisiológicas distintas y se cree que están asociadas con entidades bioquímicas como el factor de permeabilidad, el factor mitótico (o de crecimiento plaquetario) y el factor quimiotáctico. Otras proteínas, los factores de crecimiento, son secretadas de los gránulos α como factores de crecimiento plaquetario¹².

Glicoproteínas

Existen dos tipos de glicoproteínas plaquetarias: 1) glicoproteínas localizadas en los gránulos α y, 2) glicoproteínas como componentes de la membrana. Las glicoproteínas localizadas en los gránulos α son dos: la trombospondina (proteína G o proteína sensible a la trombina) es una glicoproteína elipsoidal y está compuesta de tres subunidades idénticas unidas por enlaces disulfuro; y la fibronectina, que es secretada cuando las plaquetas son estimuladas o activadas. Las glicoproteínas como componentes de membrana se mencionarán posteriormente.

ENZIMAS

Las hidrolasas ácidas son enzimas que degradan materiales en los lisosomas secundarios. Muchas de estas enzimas son secretadas de las plaquetas por fuertes estímulos (Tabla 3) durante la coagulación y sus niveles en suero son superiores que en el plasma^{12a}.

Bioquímicamente, las plaquetas son capaces de incorporar aminoácidos en las proteínas plaquetarias. El grado de síntesis es pequeño comparado con otros tejidos.

La estimulación plaquetaria está acompañada por una fosforilación, polimerización e hidrólisis (proteólisis) de varias proteínas. La fosforilación se lleva a cabo sobre la cadena

ligera de la mioisina sobre sus residuos de serina, sobre el sustrato de la proteína cinasa C, PKC, que requiere de calcio y, sobre la proteína unida a la actina.

La presencia de grupos -SH (tiol) de las proteasas plaquetarias es importante para su actividad proteolítica.

AMINOACIDOS Y PEPTIDOS

La taurina es uno de los aminoácidos contenidos en la plaqueta y equivale al contenido total del resto de los aminoácidos (21µmol/g). Otros aminoácidos presentes en concentraciones importantes son ácido glutámico, ácido aspártico, serina y glicina. La cisteína, histidina y metionina se encuentran sólo en cantidades trazas.

Las plaquetas son ricas en glutatión reducido para proteger a las plaquetas del "stress" oxidante. Cerca del 90% de la arginina en sangre circulante está asociada con las plaquetas.

Tabla 3. Enzimas plaquetarias

Vía de Embden-Meyerhof y enzimas relacionadas:	Ciclo-oxigenasa (PG sintetasa)
Glicógeno fosforilasa	Lipo-oxigenasa
Fosforilasa cinasa	Fosfolipasa C
Hexocinasa	
Fosfoglucomutasa	Metabolismo de nucleótidos y nucleósidos:
Fosfohexosa isomerasa	Adenilato cinasa
Aldolasa	Adenilato ciclasa
Trisofosfato isomerasa	Adenilosuccinato sintetasa
α -Glicerofosfato deshidrogenasa	Adeninafosforribosil transferasa
Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa	Adenosin cinasa
3-Fosfoglicerocinasa	Adenosin desaminasa
Fosfoglucomutasa	Adenosin trifosfatasa
Enolasa	Trombostenina
Piruvato cinasa	Na-K ATPasa de la membrana
Láctico deshidrogenasa	Adenilosuccinato liasa
	Desaminasa del ácido adenílico
Fosfatos de pentosa:	Fosforribomutasa
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Fosforribosilpirofosfato sintetasa
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	Fosforribosilpirofosfato cinasa
Transcetolasa	Fosfodiesterasa
Glutión reductasa	Guanilato ciclasa
Glutión peroxidasa	Hipoxantina/guanina fosforribosil transferasa
Catalasa	5'-Nucleosidasa
	Nucleótido fosfodiesterasa cíclica
Ciclo del ácido tricarbónico:	Nucleósido fosforilasa
Isocitrato deshidrogenasa	Protein cinasa C
Succinato deshidrogenasa	
Malato deshidrogenasa	Metabolismo de la serotonina:
Citocromo oxidasa	Alcohol deshidrogenasa
Transaminasa glutámicooxalacética	Aldehído deshidrogenasa
Transaminasa glutámicopirúvica	Monooxidoxidasa
Glutamato deshidrogenasa	
	Membrana plaquetaria:
Gluconeogénesis:	α -Glicerofosfato deshidrogenasa
Glicógeno sintetasa	Acetilcolina esterasa
Fructosa-1,6-difosfatasa	Ácido N-acetilneuramínico transferasa
Glucosa-6-fosfatasa	Adenilato ciclasa
Piruvato carbonilasa	Eta-p-nitrofenol fosfatasa
Fosfoenilpiruvato carboxilasa	Fosfatasa ácida
	Galactosil transferasa
Lisosomas e hidrolasas ácidas:	Glucosil transferasa
Fosfatasa ácida, alcalinas y neutras	Glutión reductasa
Leucina aminopeptidasa	Na-K-ATPasa
Catepsinas	Neuraminidasa
Peptidasas de varias especificidades	Nucleótido fosfodiesterasa cíclica
Herodicidas de varias especificidades	5'-Nucleosidasa
Arid-sulfatasa	
Elastasa	Enzimas varias
Colagenasa	Amilasa
	Arginasa
Metabolismo lipídico:	Histaminasa
Acetil-coenzima A carboxilasa	Miicina-adenosina trifosfatasa
Sintetasa de ácidos grasos	Oxido nítrico sintasa
CIP, diacilglicerofosfato-citidil transferasa	Miicina cinasa
CDP-diglicérido: mitoquinolfosfatidil transferasa	Tiocinasa*
Fosfatasa del ácido fosfatídico	Trombotano sintasa*
Lectinas	PGE ₂ , PGD ₂ , PGF ₂ sintetasa*
Fosfolipasa A ₂	GSH peroxidasa*
Diglicérido cinasa	Mono y diglicérido lipasa*

* Enzimas pertenecientes al metabolismo lipídico^{12a}.

Las plaquetas por contener aminoácidos contienen aminotransferasas y producen amoniaco durante un prolongado almacenaje, lo que sugiere que estas células metabolizan aminoácidos. Los aminoácidos no participan en la producción de ATP^{12a}.

NUCLEOTIDOS

Las plaquetas contienen nucleótidos solubles en ácidos, de bases púricas (adenina 80%, guanina 12% e hipoxantina 3%) y de bases pirimídicas (uracilo 1% y citosina 4%), y están presentes con el correspondiente di- o trifosfato.

Dos terceras partes de los nucleótidos no participan en el metabolismo pero están almacenados en los gránulos densos en un depósito especial conocido como "depósito metabólicamente inactivo de adenina". El resto de los nucleótidos participan en el metabolismo plaquetario y constituyen el "depósito metabólico".

Los nucleótidos en los gránulos densos se encuentran como complejos de alto peso molecular con cationes divalentes, lo que explica por qué los gránulos son osmóticamente estables, debido a una concentración de nucleótidos 100 veces más alta que en el citoplasma.

Otros nucleótidos que se encuentran en las plaquetas son diadenosin tetrafosfato (Ap₄A) y diadenosin trifosfato (Ap₃A)^{12,12a}.

Los nucleótidos de adenina son los más abundantes en las plaquetas. Las plaquetas sintetizan estos nucleótidos *de novo*, pero no presentan una ruta que los conserve, es decir, mediante la presencia de bases preformadas.

MINERALES Y VITAMINAS

Las plaquetas son capaces de mantener estables los gradientes catiónicos a través de la membrana plasmática, aunque el cambio con estos gradientes, por ejemplo de Na⁺ y K⁺, son importantes en la traducción de señales en plaquetas activadas.

El bombeo del gradiente catiónico requiere energía (ATP) que es modulado por la ATPasa estimulada por Na⁺-K⁺ sobre la membrana plaquetaria. Las plaquetas contienen 20.3 μmol Ca/10¹¹ células, del cual, el 60% es secretado y se encuentra en los gránulos densos (Tabla 2). El contenido de K⁺ y Mg⁺⁺ es de 6 y 130 μmoles/10¹¹ células, respectivamente; estos iones no son secretados ni reducidos.

La presencia de fósforo en los gránulos densos concuerda con las concentraciones de ATP y ADP. Estos gránulos también contienen pirofosfato inorgánico inactivo, el cual es secretado. El selenio y cobre se encuentran en grandes cantidades en la plaqueta ^{12,12a}.

Las plaquetas contienen altos niveles de vitamina E, sustancia que influye en la fluidez de la membrana *in vitro*. El α-tocoferol y otros antioxidantes tienen acción sobre la

agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, probablemente por la inhibición de la síntesis de tromboxanos. El ácido ascórbico y la vitamina B₁₂ también están presentes en la plaqueta^{12a}.

SEROTONINA

La capacidad de unir, transportar y almacenar serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) ha hecho de las plaquetas un módulo de gran importancia para las neuronas. Toda la serotonina sanguínea está presente en las plaquetas, en las cuales la amina está almacenada en los gránulos densos. Las plaquetas no sintetizan serotonina, pero la absorben de las células enterocromafines del intestino.

Existen dos sitios de unión de la serotonina sobre la superficie plaquetaria: un receptor 5₂ que transporta las señales para la activación plaquetaria y, los transportadores de serotonina a través de la membrana plaquetaria; estos transportadores se unen a los antidepresivos tricíclicos de manera competitiva.

El transporte de serotonina a través de la membrana, es un proceso activo que requiere de Cl⁻, K⁺ y Na⁺, mientras que el transporte a través de la membrana de los gránulos densos se realiza por un gradiente protónico (interior ácido) proporcionado por una ATPasa y una bomba de hidrógeno. El transportador de serotonina une reserpina.

La serotonina puede actuar como un agonista débil de las plaquetas por la interacción con los receptores de la superficie (12,12a).

COMPONENTES DE LA MEMBRANA

Todas las membranas están constituidas de lípidos (fosfolípidos) y proteínas; además, la membrana plasmática contiene receptores de glicoproteínas.

La membrana plaquetaria consta de dos capas externas que contienen proteínas; y, una capa interna que sólo contiene una bicapa lipídica.

La membrana está constituida también por carbohidratos como glucosa, galactosa, manosa, hexosaminas, fucosa y ácido siálico y la superficie de la membrana presenta una carga negativa, la cual es eliminada por la neuraminidasa, debido al ácido siálico.

Lípidos

La membrana plaquetaria es una lipoglicoproteína. Los lípidos constituyen el 3% del peso húmedo; el 80% de estos son fosfolípidos y el 20% restante son lípidos neutros, los cuales constan de colesterol libre el cual fluye en la viscosidad de la membrana junto con la vitamina E, entre los fosfolípidos internos y externos. Los fosfolípidos plaquetarios son

fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y esfingomielina. El ácido fosfatídico y *lyso*-fosfatidilcolina se encuentran sólo en pequeñas cantidades.

Entre los ácidos grasos, el diacilglicerofosfolípido es el más importante. También se encuentran cerebrosidos, gangliósidos y glicolípidos neutros.

El araquidonato es el precursor de los eicosanoides sintetizados durante la activación plaquetaria y se almacena como forma estratificada en fosfatidilcolina y fosfatidilinositol.

Los fosfolípidos individuales están asimétricamente distribuidos entre las dos capas de la membrana plaquetaria (fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en la parte interna y, la esfingomielina, en la parte externa).

La lipoproteína es liberada durante la agregación plaquetaria en dos fracciones: una sedimentable y otra no sedimentable^{12,13a}.

Glicoproteínas y receptores

Existen al menos 30 glicoproteínas (GP) en la membrana plasmática plaquetaria, pero solo 5 son de importancia. Se les identifica con números romanos, el cual incrementa conforme disminuye su peso molecular. Las glicoproteínas plaquetarias son conocidas comúnmente como integrinas y funcionan como receptoras, cada una con su propia especificidad para una o más proteínas de la matriz extracelular¹⁵.

La membrana plasmática contiene receptores para la activación plaquetaria y agonistas inactivadores; estos últimos operan a través de la estimulación del adenilato ciclasa.

La GP Ib es el receptor plaquetario para la trombina y para el factor von Willebrand (Vwf) por estimulación con ristocetina.

La GP IIb es un péptido que se une a la GP IIIa por enlace dependiente de calcio. Este complejo, conocido como GP IIb/IIIa, es el complejo más abundante de las glicoproteínas plaquetarias y forma el receptor plaquetario para el fibrinógeno y también para el factor von Willebrand^{16,17a}. Mediante estudios inmunológicos, el complejo IIb/IIIa ha demostrado ser el receptor del fibrinógeno, importante en la agregación y adhesión plaquetaria.

La GP V es una cadena sencilla la cual es hidrolizada en la superficie plaquetaria por trombina. La GPIIa se utiliza como un marcador para la activación plaquetaria *in vivo*, mientras que la GP IV (GP IIIb) es una proteína resistente a muchas proteasas¹⁸.

La plaqueta presenta receptores de insulina, los cuales han sido identificados mediante técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales y utilizando insulina-¹²⁵I y fluoresceína-isotiocianato.

El receptor de la insulina es una glicoproteína localizada en la membrana plaquetaria; está compuesta de dos subunidades α (p.m. 136,000) y dos subunidades β (p.m. 97,000), unidas por puentes disulfuro. La insulina unida a la subunidad α activa al receptor de la tirosina cinasa, quién realiza la fosforilación de la subunidad β . De estos estudios, el número de receptores de insulina ha resultado ser de 25 sitios/ μm^2 en el área superficial de la plaqueta¹⁴.

FUNCION PLAQUETARIA. LA HEMOSTASIA

La hemostasia es el proceso que detiene el flujo sanguíneo de los vasos, bajo presión, es decir, se detiene la hemorragia producida por un traumatismo de un vaso pequeño sin comprometer la fluidez de la sangre e involucrando la interacción de vasos sanguíneos y plaquetas^{18,19}.

Las plaquetas participan en la hemostasia mediante la formación del coágulo hemostático, proporcionando una superficie para el ensamble de proteínas complejas, responsables en la generación de trombina.

La función plaquetaria se relaciona con su papel mecánico y químico en la hemostasia y en la reconstitución de los vasos. Las plaquetas son fundamentales en la coagulación debido a que suministran un fosfolípido esencial⁵, que activa al fibrinógeno para la formación de fibrina⁶. Otra función de la plaqueta es promover la reparación tisular después de una lesión.

La hemostasia es el resultado de tres factores interrelacionados¹⁹:

- 1) Factores vasculares, donde se llevan a cabo reacciones intrínsecas en los vasos sanguíneos.
- 2) Factores plaquetarios, celulares o extravasculares, donde se realiza la hemostasia primaria.
- 3) Factores plasmáticos o humorales, donde se forma la fibrina, producto final en el proceso de la coagulación.

Así, la hemostasia ocurre en tres procesos que corresponden a dos etapas y en las que intervienen los factores arriba señalados^{5,19,20}:

- A) Hemostasia primaria o temporal.
- B) Hemostasia secundaria o permanente.

1) FACTORES VASCULARES.

En los vasos sanguíneos, en condiciones normales, la sangre es continua y no reacciona con las células endoteliales que se encuentran formando una barrera en contra de

las macro y micromoléculas, produciéndose cambios metabólicos que dependen de la rapidez del fluido y del grosor de la pared²¹.

La constricción de los vasos dañados, seguida de una herida, constituye una forma de defensa hemostática en animales inferiores. Esta vasoconstricción es producida por reflejos autonómicos (nerviosos) así como por la secreción. Es por esto que la vasoconstricción puede ser refleja o secundaria; la primera se caracteriza por ser inmediata y consecutiva al traumatismo vascular. La secundaria es de carácter hormonal y releva a la anterior; es producida por la adrenalina, noradrenalina y serotonina, las cuales son transportadas por las plaquetas cuando se encuentran fijados a las células endoteliales reduciendo el sangrado; no es necesaria la vasoconstricción para que la hemostasia ocurra, pero si es crítica para evitar que la sangre salga del vaso, principalmente de las arterias²⁰.

2) FACTORES PLAQUETARIOS.

Seguido al daño vascular, las plaquetas se adhieren a estructuras subendoteliales, particularmente a fibras de colágena, sin que interaccionen entre sí (Fig. 2 adhesión plaquetaria, paso 1). Este fenómeno produce la activación bioquímica de las plaquetas, sintetizándose prostaglandinas y tromboxanos (paso 2), activándose el sistema cantráctil plaquetario, fenómeno en el que se manifiesta el cambio de forma de la plaqueta de forma discoide a esferas espiculadas, y por la secreción de sustancias almacenadas en los gránulos plaquetarios (paso 3-5). Las plaquetas activadas llegan a adherirse entre sí para formar coágulos cuyo tamaño incrementa progresivamente (agregación plaquetaria, paso 4). El ADP liberado por las plaquetas o del tejido dañado es el factor principal en la iniciación y propagación de este proceso. La hemostasia permanente requiere de la presencia de fibrina, producto final en el proceso de coagulación (paso 7).

Las plaquetas juegan papeles bioquímicos importantes en este complejo proceso (acción procoagulante de las plaquetas, paso 6). La fibrina en el coágulo plaquetario disminuye la permeabilidad e incrementa la barrera hemostática. Por último, la fibrina en el coágulo permanente sufre una retracción, como resultado de otras funciones plaquetarias específicas (retracción del coágulo, paso 8^{6,20,21}).

En resumen, en la formación del coágulo hemostático se lleva a cabo una secuencia específica de eventos como son adhesión, activación, agregación primaria, secreción, agregación secundaria, acción procoagulante y la retracción del coágulo⁶.

Participación plaquetaria en la formación del tapón hemostático primario

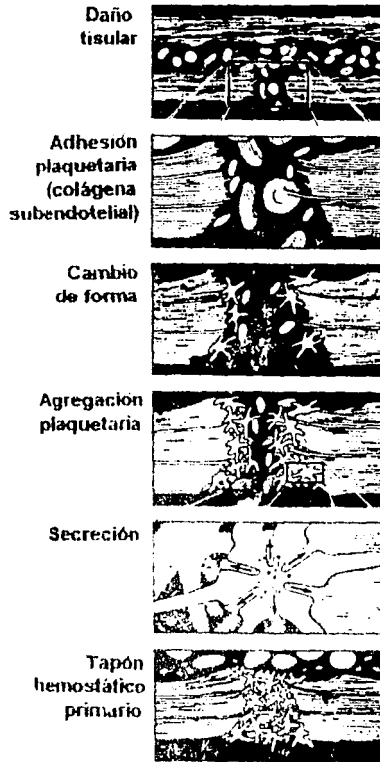


Figura 2. Función plaquetaria y formación del tapón hemostático. El tejido dañado inicia la activación de las plaquetas, las cuales empiezan a adherirse a la colágena endotelial; posteriormente sufren un cambio de forma, se agregan y secretan el contenido de sus gránulos estimulando a más plaquetas. El resultado es la formación de una barrera mecánica deteniendo el flujo sanguíneo desde el área dañada⁶.

FALLA DE ORIGEN

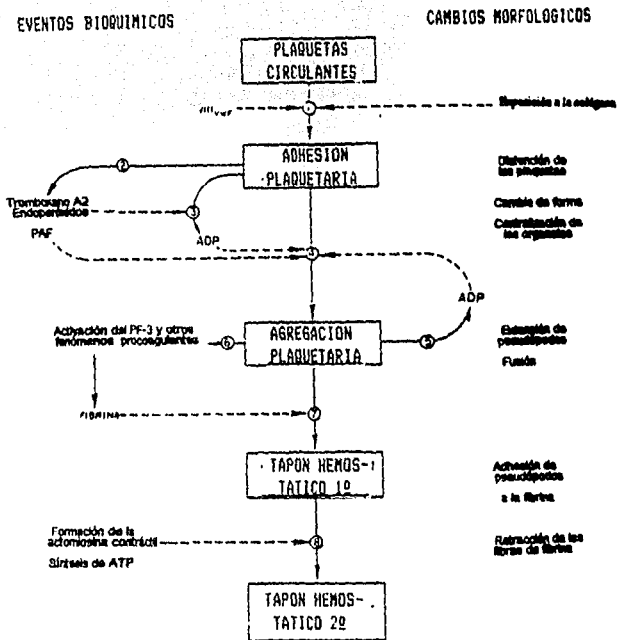


Figura 2a. Eventos bioquímicos y cambios morfológicos durante la hemostasia. Las flechas sólidas representan la transformación; las flechas punteadas representan la acción²⁰.

FALLA DE ORIGEN

Adhesión plaquetaria.

La adhesión plaquetaria ocurre cuando la plaqueta se adhiere al endotelio por diferencia de cargas. El endotelio presenta una carga negativa, pero al verse dañado cambia su polaridad volviéndose positivo; la adhesión sucede porque la plaqueta presenta una carga negativa por la presencia de ácido siálico y a un pronunciado glicocalix (glicoproteínas y proteoglicanos).

La adhesión es el primer evento en la formación del tapón hemostático primario y sirve como un importante activador plaquetario. Después de que el endotelio ha sufrido daño, las plaquetas se liberan de los vasos e inmediatamente se adhieren a las fibras de colágeno expuesto sobre la pared vascular^{6,13,20}. Las plaquetas se adhieren mediante fuerzas de deslizamiento al subendotelio, formando una monocapa, sufriendo un cambio de forma y emitiendo pseudópodos cuando se activan^{22a}.

La adhesión plaquetaria es un proceso que involucra estructuras subendoteliales, factores físicos, proteínas plasmáticas y receptores plaquetarios. El subendotelio está constituido de colágena, tejido elástico (elastina y microfibrillas), proteínas no colagénicas (laminina y fibronectina) y glicosaminoglicanos (sulfato de heparán, sulfato de dermatán y ácido hialurónico)^{3,20}.

Las bases bioquímicas sobre la adhesión plaquetaria no han sido establecidas con certeza. Una teoría atribuye la adhesión plaqueta-colágena a la formación de un complejo enzima-receptor, entre la glucosil transferasa de la colágena de la membrana plaquetaria y los residuos completos de los heterosacáridos (galactosil de colágena). Otra teoría sugiere que la unión plaqueta-colágeno se debe a la fibronectina, que es sintetizada en el endotelio, almacenado en los gránulos α y liberada durante la activación plaquetaria²⁰.

La adhesión de la plaqueta a la colágena requiere de la conformación de la triple hélice de la colágena debido a la presencia de cationes divalente como Mg^{++} o Mn^{++} (el Ca^{++} es inhibidor). También se debe a la estructura primaria de los aminoácidos y a su porción de carbohidratos del colágeno^{2,18,23}.

Para que las plaquetas tengan contacto y se dispersen sobre el subendotelio, requieren del factor von Willebrand (vWf) el cual presenta dos sitios de unión: uno para la GP Ib y otro para el complejo GP IIb/IIIa^{5,18} (Fig. 3). La unión entre vWf y la GP Ib no requiere de cationes divalentes pero estos cationes se requieren para la unión entre el vWf y el complejo GP IIb/IIIa. La carencia de vWf o de la GP Ib ocasiona una incapacidad de la plaqueta a adherirse (enfermedad de Bernard-Soulier y enfermedad de von Willebrand).

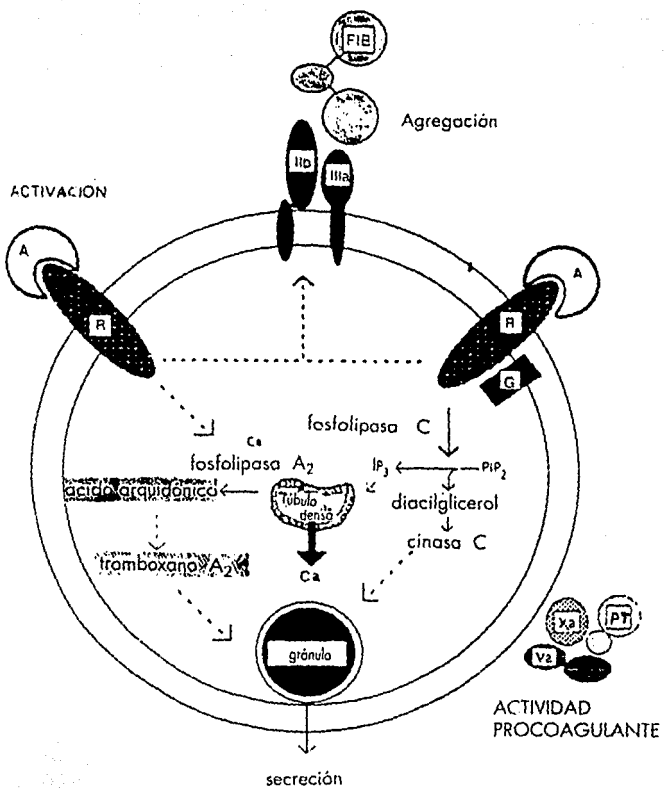


Figura 3. Acoplamiento de la respuesta de señales. A=agonista; R=receptor; Ca=calcio; G=proteína unida a la guanina; PIP₂=fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; IP₃= inositol-1,4,5-trifosfato; Va=factor V de coagulación activado; Xa=factor X de coagulación activado; PT=protrombina¹⁹.

FALLA DE ORIGEN

La adhesión plaquetaria al subendotelio se debe a la formación de endoperóxidos de prostaglandinas y tromboxano A₂ (TX A₂), y a la liberación de ADP plaquetario²⁵.

Las plaquetas se adhieren a matrices extracelulares durante la hemostasia y trombosis. Además de presentar receptores para integrinas, las plaquetas presentan sobre su superficie receptores no integrínicos para algunas proteínas de matrix celular como GP Ib/IX, un receptor para el vWf y la GPIIb. Las plaquetas también expresan moléculas en la adhesión célula-célula como las PECAM-1, las cuales promueven la adhesión plaquetaria entre sí y entre las células endoteliales y, las PADM o GMP-140 (receptores de la familia de las selectinas) que reconocen los carbohidratos sobre la superficie de leucocitos¹⁶.

Activación plaquetaria

La adhesión de las plaquetas a las fibras de colágena desencadenan cambios morfológicos y funcionales en la plaqueta conocidos como activación. Las plaquetas activadas presentan tres características:

- Cambio de forma.
- Desarrollo de receptores superficiales.
- Cambio en la orientación de los fosfolípidos de la membrana.

La primera característica de la activación plaquetaria es el cambio de forma, una transformación de células discoideas a esferas con proyecciones espinosas en la superficie. En dichas proyecciones (pseudópodos) se forman los microfilamentos por polimerización de las moléculas de actina. Estos pseudópodos ayudan a incrementar la posibilidad de contacto entre las plaquetas, permitiéndolas adherirse unas a otras. La transformación de la plaqueta incrementa el área superficial mientras que disminuye la repulsión electrostática debido a que la carga superficial disminuye^{5,6}.

Esta característica está asociada con la contracción de los microtúbulos marginales, situando a gránulos y organelos en un área pequeña del centro de la esfera y formando pseudópodos. Se cree que el mecanismo de contracción es regulado por el complejo troponina-tropomiosina unido a la actina y por los niveles de AMPc^{3,6,15,20}.

La segunda característica comprende cambios en la cubierta superficial y en la membrana plasmática, de modo que las glicoproteínas actúan como receptores de diversos estímulos conocidos como inductores o agonistas. Se dice que la superficie se vuelve "pegajosa" y desarrolla sitios receptores para GP Ib, factor von Willebrand y colágena.

Además de la GP Ib en la membrana, se han identificado receptores para trombina, colágeno, ADP y adrenalina^{6,16}.

Como en otras células, el calcio y el AMPc regulan muchas de las respuestas plaquetarias actuando como mensajeros intracelulares. el cambio de forma, la agregación, la secreción y activación del sistema contráctil, son mecanismos debidos a un incremento en el contenido de calcio en el citosol plaquetario. Este incremento inhibe a la enzima *adenilato ciclasa* con una disminución de AMPc. Como el AMPc disminuye, existe calcio adicional que es movilizado; para esto, existen una serie de respuestas que requieren un incremento en la estimulación, por tanto, un incremento en las concentraciones de calcio: a) cambio de forma; b) agregación plaquetaria; c) rompimiento del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana; d) secreción de los gránulos α ; e) secreción de los gránulos densos y, f) secreción de hidrolasas ácidas^{6,15,20}; el ADP y la adrenalina sólo inducen las dos primeras respuestas, la colágena y la trombina inducen las seis respuestas.

El AMPc trabaja, como en otras células, como segundo mensajero. El AMPc se sintetiza a partir del ATP y es catalizado por la adenilato ciclasa y su degradación a AMP es catalizada por la fosfodiesterasa^{15,20}.

El AMPc interviene en la respuesta plaquetaria frente a diversos estímulos. Si aumentan los niveles de AMP en la plaqueta, queda inhibida la agregación plaquetaria. La adherencia con la colágena también es inhibida por los agentes que elevan la cantidad de AMPc¹³.

El calcio estimula a la fosfolipasa C, diglicérido lipasa y, en presencia de calmodulina, a la fosfolipasa A₂. por el contrario, el AMPc inhibe a la fosfolipasa C, fosfolipasa A₂ y a la ciclo-oxigenasa. Algunos inhibidores de la función plaquetaria incluyen muchos fármacos que actúan para inhibir a la fosfodiesterasa, produciendo un aumento en las concentraciones de AMPc. El mecanismo por el cual el AMPc inhibe la reactividad plaquetaria es mediante la regulación que tiene el nucleótido sobre la ciclo-oxigenasa y la fosfolipasa y que actúan sobre la protein-cinasa plaquetaria²⁰.

La última característica de la activación plaquetaria involucra a los fosfolípidos de la membrana. Los fosfolípidos concentrados en la capa media interna de la bicapa lipídica, especialmente fosfatidilserina, son rearrreglados y llegan a estar expuestos en la capa media externa⁶.

Los fosfolípidos participan en la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos. Los fosfolípidos de la membrana son hidrolizados por la acción de la fosfolipasa A₂ formando ácido araquidónico (Fig.4). Este ácido graso se convierte en endoperóxidos cíclicos (PGG₂ y PGH₂), como resultado de la acción de la ciclo-oxigenasa, enzima que es inhibida por fármacos como el

ácido acetilsalicílico. Los endoperóxidos cíclicos son compuestos que actúan para iniciar la reacción de liberación, generalmente ellos se convierten en tres compuestos activos²⁰ (Fig. 5):

- Tromboxano A₂.
- Prostaglandinas estables.
- Prostaciclina.

El TX A₂ es formado por los endoperóxidos por la enzima tromboxano sintetasa, una conversión que se realiza sólo en las plaquetas, es degradado en una sustancia inactiva, TX B₂; *in vitro*, el TX A₂ es el activador más potente y es el principal mediador de la agregación y liberación plaquetaria, además de ser un potente vasoconstrictor, actuando *in vitro* sobre el sistema AMPc.

Las prostaglandinas estables. PGF-2, PGD-2 y PGE-2 son originadas de los endoperóxidos plaquetarios por procesos no enzimáticos. La PGE-2 inicia la reacción de liberación *in vitro*, pero es menos potente que el TX A₂. La PGD-2 es un inhibidor de la activación plaquetaria. La PGE-1 es una prostaglandina que no es común en la plaqueta pero que sí es un inhibidor potente de la función plaquetaria. *In vitro*, PGD-2, PGE-1 y PGE-2 actúan sobre el sistema AMPc.

Las prostaciclina son sintetizadas por células endoteliales y leucocitos, no son producidas por las plaquetas. Los endoperóxidos son convertidos en prostaciclina por la enzima prostaciclina sintetasa²⁰.

Las plaquetas poseen un grupo guanilato ciclasa soluble, el cual, cuando son activadas, inducen un incremento en el GMP cíclico (GMPc) del que se pensaba era el responsable de la agregación plaquetaria y que antagonizaba las acciones del AMPc. Actualmente se sabe que los nitrovasodilatadores y el óxido nítrico (NO) son los que estimulan al grupo guanilato ciclasa e incrementan los niveles de GMPc, inhibiendo la agregación plaquetaria²⁴.

Las plaquetas interactúan con otras células durante su activación, tal es el caso de los eritrocitos (que incrementan los niveles de TX B₂), los leucocitos polimorfonucleares (que pueden producir agregación e incremento en los niveles de calcio citoplasmático y producción de TX B₂) y en células endoteliales (inactivan el ADP plaquetario y captan y degradan aminas vasoactivas). Los mecanismos de activación están relacionados con el metabolismo del fosfatidilinositol y la vía del ácido araquidónico, además de la acción de los dos segundos mensajeros con propiedades opuestas: calcio (activación) y AMPc (inhibición)^{22a}. (Figs. 4 y 5).

Agregación plaquetaria.

Debido a que el objetivo de este trabajo es a cerca de la agregación, el proceso completo se explicará con más detalle en las páginas posteriores.

Cuando el calcio citosólico alcanza la concentración adecuada, las plaquetas nuevas que entran al área lesionada, empiezan a adherirse a las ya existentes, liberando su contenido. A la adhesión de las plaquetas entre sí se conoce como agregación. Al parecer esta agregación se efectúa en dos etapas denominadas "primaria" y "secundaria". La primaria es el conglomerado plaquetario laxo que se forma al principio sin secreción y es reversible, mientras que la agregación secundaria es irreversible y es regulada por la secreción plaquetaria de ADP no metabólico de los gránulos densos y TX A₂. La agregación implica acciones intracelulares y superficiales.

Secreción plaquetaria.

Después de la adhesión, del cambio de forma y de la agregación primaria, las plaquetas empiezan a liberar sustancias al medio circundante a través del sistema canalicular. Este proceso se conoce como liberación o secreción plaquetaria y se inicia, al igual que en la agregación, en el momento en el que un agonista se une a la membrana plasmática^{5,6,22}, se pierde la forma discoide, apareciendo hinchazón irregular con pseudópodos múltiples y los microtúbulos marginales desplazan a los organelos hacia el centro de la célula de manera que los gránulos quedan agrupados. La contracción de los microtúbulos marginales parece constituir la esencia del fenómeno, se altera el sistema canalicular y los elementos periféricos relacionados con la superficie de la plaqueta se dilatan. Los conductos del sistema canalicular constituyen varias vías por las cuales llegan a la superficie las sustancias secretadas^{3,13,22}.

La plaqueta se comporta como una célula secretora, cuya estimulación conduce a la expulsión de sustancias almacenadas en los gránulos, sin pérdida de enzimas del citoplasma, ni de mitocondrias, ni de daño a la membrana. La reacción requiere de energía, ATP, que proviene de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa^{8,13,15}, pero no requiere del transporte de membrana ni de enzimas mitocondriales o citoplasmáticas¹⁶.

Las sustancias liberadas de los gránulos plaquetarios tienen varias funciones, algunas de ellas definidas y otras desconocidas. Las sustancias amplifican la formación del tapón plaquetario al atraer nuevas plaquetas que se adhieren, secretan y agregan, formando un tapón mecánico o masa que sella la lesión impidiendo la salida de la sangre ⁶, esta masa se conoce como "metamorfosis viscosa". En efecto, la reacción de liberación es reversible bajo

ciertas condiciones y las plaquetas pueden sobrevivir *in vivo* después de sufrir liberación parcial o total²⁰.

Durante la liberación, más de cuarenta sustancias son secretadas por las plaquetas cuando son estimuladas, algunas de estas sustancias son metabólicamente activas y otras, son importantes en la homeostasia y en la coagulación:

NUCLEOTIDOS DE ADENINA: ADP, ATP.

AMINAS: Serotonina, epinefrina, norepinefrina, aminoácidos.

ENZIMAS: Hidrolasas ácidas, colagenasa, β -Lisina, endoglucosidasa.

IONES: Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Pi.

PROTEINAS: Fibrinógeno, albúmina, factor V, factor VIII, PF-3, PF-4, β -tromboglobulina, α -1-antitripsina, proteoglicanos, factor quimiotáctico y PAF.

OTROS: Lipoproteínas, mucopolisacáridos, prostaglandinas y tromboxanos.

La secreción plaquetaria es inducida por segundos mensajeros generados de la interacción de agonistas con receptores sobre la superficie plaquetaria. Para agonistas débiles como ADP o epinefrina, la síntesis de PG's y TX A₂ son requisito para la secreción sólo de los constituyentes de los cuerpos densos (liberación I), mientras que agonistas fuertes como trombina o colágena generan la secreción tanto de los cuerpos densos como de los gránulos α (liberación II) ^{21,22}. Es así como la agregación inicia la reacción de liberación.

La síntesis de PG's, sus endoperóxidos y TX A₂ son necesarios para la respuesta secretora a los agentes inductores. El paso inicial es esta ruta es la liberación de ácido araquidónico quién da origen a PGE₂, PGF_{2 α} , TX A₂ y PGI₂. Como el ácido araquidónico se encuentra en muy baja cantidad, la síntesis de PG'S y TX's requiere de la liberación de araquidonato, el cual está unido por enlace éster a los fosfolípidos de la membrana. El ácido araquidónico liberado sirve como sustrato para la ciclooxigenasa y lipoxigenasa.

De lo anterior, se han propuesto dos rutas enzimáticas: en la primera, una o más enzimas (fosfolipasas A₂, PLA₂), liberan directamente ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. En la segunda, la fosfolipasa C, PLC, específica para fosfatidilinositol, libera fosfato de inositol el cual es reutilizado en el ciclo polifosfoinoscétido.

El ácido araquidónico también es sintetizado de una ruta directa a partir del 1,2-diacilglicerol, 1,2-DAG, y por la enzima 1,2-DAG lipasa, proceso dependiente de calcio²³. (Fig. 4).

La lipoxigenasa forma hidroperóxidos inestables que se transforman a hidroxiácidos estables. La ciclooxigenasa forma endoperóxidos inestables. Esta enzima presenta activada tanto oxigenasa como de peroxidasa (Fig. 5).

Por último, los niveles de AMPc suprimen la reacción de liberación de tres maneras^{3,6}:

- Inhibiendo la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos.
- Induciendo la salida de Ca^{++} citoplasmático por los microsomas plaquetarios.
- Inmovilizando el aparato contráctil requerido para la secreción, bloqueando la fosforilación de la cadena ligera de la miosina-cinasa.

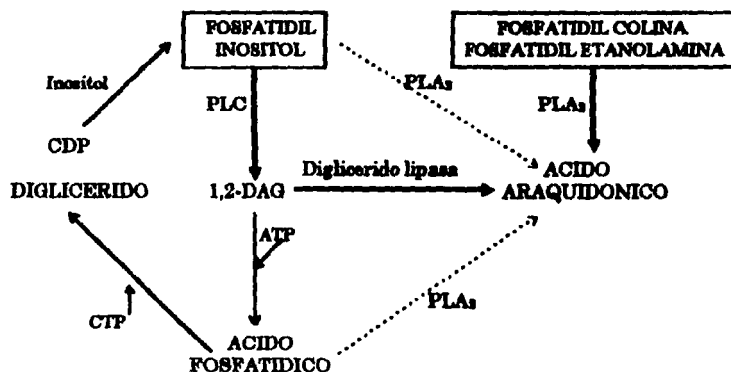


Figura 4. Rutas para la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana. Todas las enzimas involucradas requieren de calcio³.

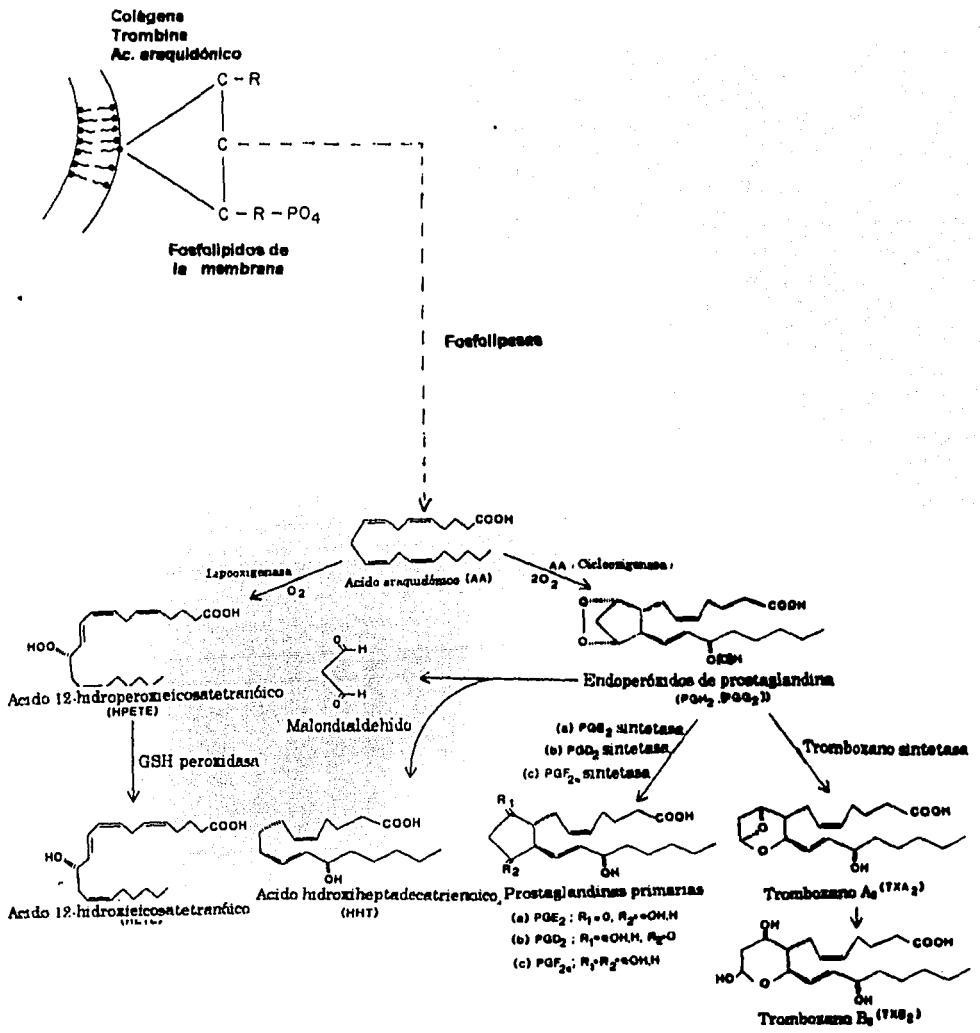


Figura 5. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico generado por la PLA₂ por hidrólisis de diversos fosfolípidos de la membrana.¹⁰

FALLA DE ORIGEN

3) FACTORES PLASMATICOS

La coagulación de la sangre comprende la interacción de diversos factores plasmáticos o humorales que convierten a una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, en fibrina, la cual es un polímero insoluble y que es la base física del coágulo hemostático *in vivo*. La evolución de fibrina es el mecanismo por el cual la coagulación contribuye en la función hemostática ²⁰.

A los factores plasmáticos se les denomina con números romanos de acuerdo al orden de su descubrimiento y no a la secuencia en la reacción de coagulación. Se distinguen de los factores plaquetarios cuyo número y orden vienen indicados con números arábigos:

Factor I	Fibrinógeno.
Factor II	Protrombina.
Factor III	Tromboplastina o factor tisular.
Factor IV	Calcio (iones).
Factor V	Proacelerina.
Factor VII	Proconvertina.
Factor VIII	Factor antihemofílico A.
Factor IX	Factor antihemofílico B o factor de Christmas.
Factor X	Factor de Stuart-Prower.
Factor XI	Factor antihemofílico C.
Factor XII	Factor de Hageman.
Factor XIII	Factor estabilizante de fibrina.
Precalicerina	Factor de Fletcher.
Kininógeno de alto peso molecular	Factor de Fitzgerald-Williams (HMWK).

Los factores de coagulación se dividen en tres grupos dependiendo de sus funciones bioquímicas y propiedades fisiológicas²⁰:

A) Grupo de la protrombina: Requieren contacto con una superficie para su activación e incluye los factores XI, XII, precalicerina y kininógeno (HMWK).

B) Grupo de la Trombina: Son sintetizados por las células hepáticas por lo que requieren de vitamina K; son adsorbidos desde el plasma por BaSO₄ o gel de Al(OH)₃. Este grupo incluye a los factores II, VII, IX, X y proteína C. Son de tamaño intermedio.

C) Grupo del fibrinógeno: Son grandes moléculas y están ausentes en el suero. Se les considera el grupo combustible porque son consumidos durante la formación de fibrina. Los factores que integran a este grupo son el I, V, VIII y XIII.

La formación primaria del tapón plaquetario tiene una inestabilidad relativa y se desprende con facilidad. El tapón se estabiliza y sujeta con firmeza a la pared vascular al agregarse la fibrina y, aún más, por la contracción final de la masa entera plaqueta-fibrina. Las plaquetas participan en estos dos procesos, en la formación de fibrina a través de la

actividad procoagulante y, en la retracción del coágulo. De esta manera inicia la hemostasia secundaria.

Actividad procoagulante plaquetaria

Las plaquetas proporcionan una superficie para el ensamble de diversos complejos enzimáticos que participan en la generación de trombina. De esta manera, las plaquetas participan en la reacción de la protrombinasa, contribuyen a la activación del factor X y proporcionan una superficie para la fase de contacto de la coagulación del factor XI activado. A la actividad procoagulante plaquetaria se le conoce también como factor plaquetario 3 (PF-3)¹⁸.

Contracción del coágulo

In vitro, la formación del coágulo de fibrina es seguida por la contracción del coágulo, un fenómeno que requiere de plaquetas activadas. Esto significa que la contracción del citoesqueleto genera la fuerza necesaria para el proceso mediante la unión de las cadenas terminales de la fibrina con el complejo GP IIb/IIIa y que la membrana de esta glicoproteína (pseudópodos + fibras de fibrina) transmite dicha fuerza de contracción a las fibras de fibrina para que se contraiga el coágulo¹⁸.

In vivo, el resultado de la contracción del coágulo es una masa cohesiva de plaquetas y fibrina. La contracción permite que se restablezca de manera más normal la circulación sanguínea a través del vaso. La masa estable de plaqueta-fibrina permanecerá en el lugar hasta que los fibroblastos reparen la herida como curación permanente⁶.

HEMOSTASIA SECUNDARIA

Debido a que el objetivo del presente trabajo se enfoca únicamente a la hemostasia primaria, se enunciará brevemente la hemostasia secundaria con el fin de complementar el proceso.

La hemostasia secundaria es el proceso que consolida y oculta en forma total y definitiva el tapón hemostático primario mediante el depósito de fibrina y ocurre en cuatro etapas:

- 1) Coagulación plasmática.
- 2) Formación de la trombina.
- 3) Formación de la fibrina.
- 4) Fibrinólisis.

1) Coagulación plasmática.

La coagulación es el resultado final de una serie de reacciones complejas en donde están involucradas proteínas procoagulantes que circulan en el plasma como precursores inertes hasta su conversión a sus formas activas mediante reacciones en cadenas específicas⁶, y la presencia de jugos y plasma tisulares¹³.

Esta serie de reacciones consta de dos rutas que entre sí conforman la cascada de coagulación: la ruta intrínseca o vía lenta y, la ruta extrínseca o vía rápida.

La ruta intrínseca se inicia por la exposición de los factores de contacto hacia las estructuras vasales por debajo del endotelio. Los cuatro factores de contacto son el factor XII, XI, precalicreína y el HMWK de alto peso molecular. Los tres primeros son simógenos, mientras que el kininógeno sirve como un cofactor para la activación de los otros tres. Los factores se unen a la superficie de contacto por tener carga negativa, por lo que los iones calcio no se requieren para la unión.

Inicia cuando el factor XII es activado a XIIa por la superficie de contacto o a través de la calicreína, proceso que es acelerado por el HMWK. El factor XIIa activa a la precalicreína y, mediante un "feedback" positivo se activan los factores XI→XIa, IX→IXa y HMWK; en presencia de calcio, el factor VIII y el PF-3 forman un complejo conocido como "activador intrínseco del factor X"; el factor X es quién da inicio a la ruta común (Fig 6).

Los primeros pasos de esta ruta son denominados "fase de contacto" porque son activados por la exposición del plasma hacia cualquier superficie no endotelial incluyendo membrana basal, colágena insoluble y las superficies procoagulantes de las plaquetas estimuladas por colágena. Las plaquetas activadas no generan directamente el factor XIIa pero proporcionan una superficie rica en receptores que alteran la conformación del factor XII⁶.

La ruta extrínseca se inicia por la interacción entre el factor VII y el factor tisular (tromboplastina) que es liberado por el vaso dañado. Ambos factores presentan actividad enzimática en su estado nativo pero esta actividad se incrementa cuando estos dos factores interactúan. Esta reacción requiere de iones calcio.

La interacción entre el factor VII y la tromboplastina genera un cambio conformacional en la molécula del factor VII produciendo la unión al factor X, incrementando su actividad catalítica. La conversión del factor VII a VIIa es rápida mediante un "feedback" positivo; el factor VII también puede activarse por una serie de enzimas como plasmina, calicreína, factor XIIa, factor IXa, factor XIa y factor Xa. Estas enzimas rompen un enlace sencillo en el factor VII formando una proteasa de dos cadenas (factor VIIa) que aumenta la

actividad enzimática. El factor VIIa también requiere del factor tisular para su completa actividad. En presencia de calcio, estos tres elementos integran el complejo "activador extrínseco del factor X"^{6,30} (Fig. 6).

El factor X es activado por los complejos enzimáticos o activadores que son productos finales de las dos rutas anteriores. Este mecanismo se conoce como la ruta común. La activación del factor X se realiza en dos pasos: en el primero, una ruptura en el enlace N-terminal da origen a una molécula intermediaria (factor Xa₂); segundo, un rompimiento lento en el enlace C-terminal que da origen al factor Xa. El factor Xa se une con el PF-3, calcio y el factor V para formar un complejo enzimático que participa en la activación de la trombina, conocido como protrombinasa (Fig. 6).

La protrombinasa rompe dos enlaces en la protrombina dando origen a la trombina que posteriormente ésta hidrolizará proteolíticamente al sustrato del fibrinógeno para formar un monómero de fibrina, el cual presentará cambios de fuerzas electrostáticas en sus dominios, haciendo que la fibrina empiece a polimerizarse y sea soluble en urea.

La reacción final consiste en la estabilización del polímero de fibrina catalizada por el factor XIII, el cual es activado por la trombina. El factor XIIIa es una transamidasa dependiente de calcio, cuya función es estabilizar a la fibrina y volverla insoluble en urea^{5,8,13,30,31}.

Con la formación de fibrina insoluble en urea, la cual encierra en sus mallas los elementos figurados de la sangre para formar un coágulo, termina la fase de la coagulación, quedando únicamente la activación del plasminógeno para que se lleva a cabo la fibrinólisis y termine con ella la hemostasia secundaria.

La fibrinólisis es el conjunto de procesos que conducen a la disolución del coágulo de fibrina y se debe a la presencia de una enzima proteolítica conocida como plasmina, formada a partir de su precursor: el plasminógeno. La activación del plasminógeno es el resultado de diferentes activadores o agentes que pueden ser de origen bacteriano, tisular o químico y otros como la uroquinasa o el factor XII que actúan induciendo la formación de plasmina³¹.

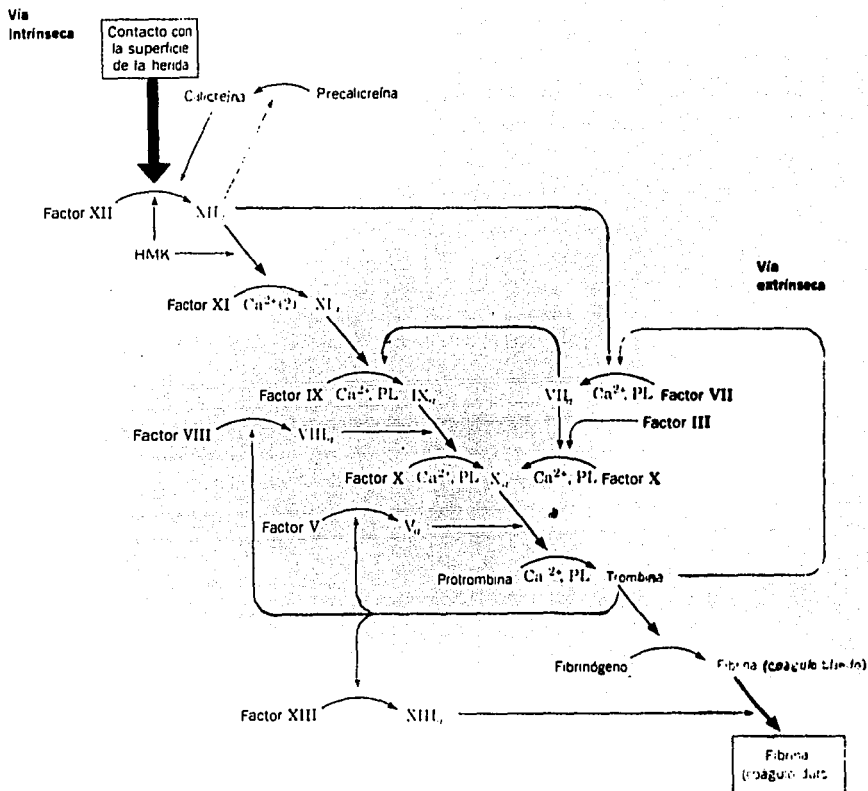


Figura 6. Cascada de la coagulación sanguínea y división de sus dos etapas iniciales: vía intrínseca y vía extrínseca. Nótese de las numerosas reacciones de retroalimentación que aceleran y/o acoplan estas vías⁹¹.

FALLA DE ORIGEN

AGREGACION PLAQUETARIA

AGREGACION PLAQUETARIA

La agregación plaquetaria es una de las funciones principales que se realizan para el control del sangrado cuando existe una lesión interna o externa; se define, como ya se ha mencionado, como la capacidad que tienen las plaquetas de adherirse entre sí.

Los estudios de agregación plaquetaria han demostrado ser útiles en la detección de enfermedades congénitas y adquiridas o, anormalidades inducidas por fármaco que afectan la función plaquetaria y pueden ser en dos formas:

- Agregación *in vivo*.
- Agregación *in vitro*.

La agregación *in vivo* es inducida por una serie de estímulos, principalmente ADP, el cual debe estar presente para que la trombina pueda causar agregación, pero en ausencia de ADP la trombina sigue modificando la morfología de la plaqueta¹³.

Para que se lleva a cabo la agregación es necesaria la presencia de iones calcio y magnesio en pequeñas cantidades, los cuales no son indispensables para el cambio de forma, fenómeno que precede a toda agregación. La agregación inicial plaquetaria conduce a la formación de un trombo blanco, lacio y con pequeños canales que son permeables, permitiendo el paso de la sangre. Después la agregación entra a una fase denominada irreversible, con transformación morfológica de la plaqueta que conduce a la impermeabilización del coágulo¹⁴.

Anterior a la década de los 80's se sabía que existían dos mecanismos que operaban en la agregación: el primero es la liberación de ADP; el segundo, la formación de TX A₂. Para 1980, Vergaftiz *et al* describieron una tercera ruta de agregación en la cual el factor de activación plaquetaria (PAF) era quien estaba involucrado en este proceso. Este factor es un compuesto fosfolipídico sintetizado por los macrófagos y basófilos¹⁵.

Por otra parte, no existe agregación plaquetaria en sangre que permanece inmóvil *in vitro*. Debe existir una agitación suficiente para producir un mínimo de colisiones antes de que ocurra la agregación y las plaquetas deben ser bastante numerosas para que tengan lugar dichas colisiones.

Mecanismo de acción

La membrana plaquetaria contiene receptores para un cierto número de agentes agonistas o inductores que son liberados, adicionados, generados o expuestos a los sitios del

trauma vascular. Estos agentes se unen a las plaquetas e inician una serie de reacciones bioquímicas que conducen a la formación del agregados plaquetarios, a la liberación del contenido de los gránulos y al cambio de forma¹⁹. Born sugiere que el cambio de forma es el resultado de la interacción del ADP plaquetario con las proteínas contráctiles cercanas a la superficie celular²⁰.

Parece ser que la mayoría de los agentes actúan por dos vías que inducen la secreción de ADP. El fenómeno inicial consiste en una interacción de ciertos puntos específicos de la molécula de colágena y glicoproteínas de la superficie plaquetaria, con lo cual activan a la fosfolipasa A₂ que cataliza la remoción del ácido araquidónico de los fosfolípidos plaquetarios. El ácido removido es convertido a endoperóxidos de prostaglandinas para dar origen al TX A₂ que constituye el estímulo determinante de la secreción, funcionando como potentes agonistas y vasoconstrictores. Las sustancias anteriores son intermediarios inestables en la formación de prostaglandinas, actuando como inductores de la liberación del ADP^{19,21,22}.

Las reacciones de agregación *in vitro* dependen del pH, temperatura, agitación mecánica, concentración de iones calcio, número de plaquetas en el plasma rico (PRP), tiempo transcurrido entre la ejecución de la prueba y la preparación del PRP, la "atmósfera" plaquetaria (constituyentes plasmáticos) y el tipo y concentración de los agentes inductores.

La agregación óptima requiere que el pH en PRP sea entre 6.8 y 8.5. A pH menor, la agregación no puede inducirse. La temperatura óptima es de 37 °C; menor a 32 °C la agregación no ocurre. La agitación mecánica con barra magnética a velocidad constante (1,100 rpm) es esencial²².

INDUCTORES DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

La agregación plaquetaria *in vitro* es estimulada por una diversidad de agentes agonistas produciendo patrones de agregación.

La agregación plaquetaria presenta dos fases u "ondas". La primera onda o agregación primaria se debe a la estimulación de los agentes agonistas, es reversible y no está asociada a la secreción plaquetaria. La segunda onda o agregación secundaria corresponde a la formación irreversible de grandes agregados debidos a la secreción plaquetaria. Si la concentración de los agonistas es suficiente, la primera y segunda onda se fusionarán en un solo trazo continuo²¹ (Fig. 7).

Los agentes agonistas se han clasificado como "débiles" o primarios y "fuertes" o secundarios dependiendo de su capacidad para estimular la secreción de los gránulos plaquetarios en presencia (débiles) o en ausencia (fuertes) de la agregación plaquetaria, es decir, los agonistas débiles son capaces de iniciar la agregación sin activar el sistema tromboxano-prostaglandina y sin inducir la liberación de ADP plaquetario, pero dependen de una estimulación autocrina para llevar a cabo la respuesta. Los agonistas fuertes inician la agregación por la activación del sistema tromboxano-prostaglandina o por la reacción de liberación y no requieren de una estimulación autocrina^{20,21} (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de agonistas de acuerdo a su capacidad de estímulo

Agonistas débiles	Agonistas fuertes	Otros	
Adenosin difosfato (ADP)*	Trombina*	Fibrinógeno*	Virus y bacterias
Epinefrina (adrenalina)*	Colágena*	Serotonina*	Superficie de las
Noradrenalina	Ristocetina*	Ionóforo A 23,187*	γ-globulinas
Vasopresina	Ac. araquidónico*	Polipéptidos catiónicos	
Factor de la activación plaquetaria (PAF)*		Complejo Ag-Ab	
		Tromboxafax	

* Agonistas de mayor uso en el diagnóstico clínico.

1) ADP

Como ya se mencionó, el ADP es uno de los constituyentes de los gránulos plaquetarios que se libera cuando las plaquetas son expuestas a los agentes agonistas, induciéndose la liberación del mismo nucleótido. El ADP es liberado también de los eritrocitos e incluso, del tejido dañado. En presencia de calcio, el ADP a bajas concentraciones induce agregación plaquetaria, seguida por una desagregación¹⁵; es regulada por el complejo GP IIb/IIIa, el cual une al fibrinógeno y a otras proteínas adhesivas²² para activar a las plaquetas e inhibir al adenilato ciclasa. Recientemente se ha identificado un sitio de unión de alta afinidad del nucleótido, el cual se encuentra sobre GP IIb, lo que sugiere que esta glicoproteína podría funcionar como receptor del ADP²³.

La respuesta inicial de las plaquetas estimuladas por ADP es el cambio de forma^{11,16}; al mismo tiempo, los receptores específicos para el fibrinógeno aparecen sobre la superficie plaquetaria, lo que significa que el fibrinógeno sirve como un puente para unir a las plaquetas entre sí^{5,11,18}. Su capacidad para inducir la secreción depende de la capacidad de las plaquetas para sintetizar prostaglandinas.

En resumen, la agregación inducida por ADP requiere de cofactores como el fibrinógeno, calcio y, probablemente de factores de coagulación dependientes de vitamina K.

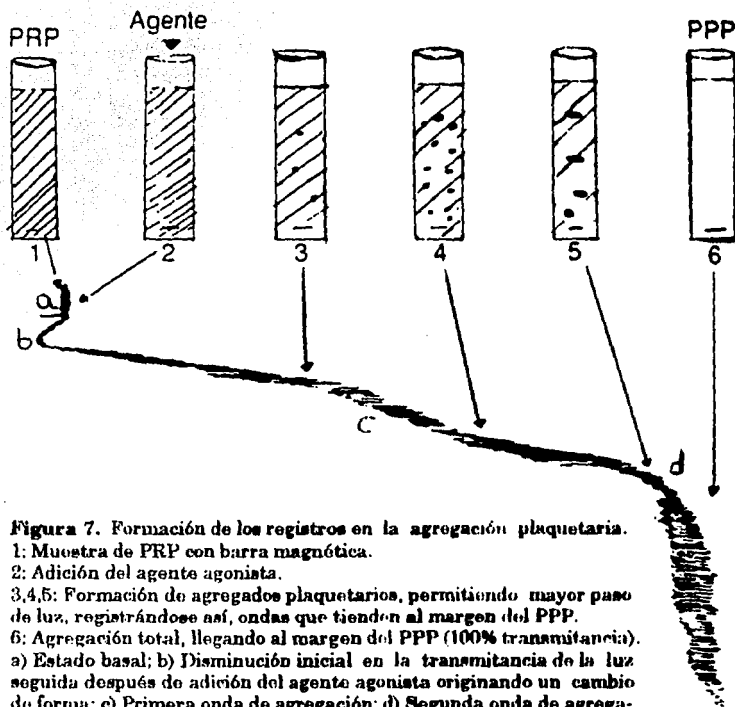


Figura 7. Formación de los registros en la agregación plaquetaria.

1: Muestra de PRP con barra magnética.

2: Adición del agente agonista.

3,4,5: Formación de agregados plaquetarios, permitiendo mayor paso de luz, registrándose así, ondas que tienden al margen del PPP.

6: Agregación total, llegando al margen del PPP (100% transmittancia).

a) Estado basal; b) Disminución inicial en la transmitancia de la luz seguida después de adición del agente agonista originando un cambio de forma; c) Primera onda de agregación; d) Segunda onda de agregación, generada en respuesta a las sustancias secretadas.

Las características de las ondas de agregación inducidas por ADP varían de acuerdo a la concentración del nucleótido. Si la concentración es baja ($1\mu\text{M}/\text{ml}$) se produce una reducción de la transmisión de luz debido al cambio de forma de las plaquetas y es seguida por un aumento brusco de la transmisión de luz. En concentraciones de $2.5\mu\text{M}/\text{ml}$, el período inicial del aumento de la transmisión de luz y luego por un aumento de gran magnitud e irreversible originando dos ondas de agregación (agregación bifásica) (Gráfica 1).

2) Epinefrina

La epinefrina o adrenalina activa a las plaquetas por unirse a receptores adrenérgicos α_2 sobre la superficie plaquetaria. Al igual que el ADP, la capacidad de la epinefrina para estimular la secreción plaquetaria y la agregación secundaria depende de la síntesis de prostaglandinas^{6,18}.

La epinefrina induce la agregación primaria en ausencia de cambio de forma y eleva la capacidad de otros agonistas plaquetarios, actuando como modulador (Gráfica 2).

3) Trombina

La trombina es el agonista más potente. Estimula el cambio de forma de la plaqueta y la agregación primaria y secundaria, disminuye la actividad del adenilato ciclasa inhibiendo los niveles de $\text{AMPc}^{2,19}$. Como agonista "fuerte", estimula la secreción plaquetaria; por ser una enzima, su capacidad para activar las plaquetas depende de la concentración.

Es un agonista que rápidamente activa a la fosfolipasa C (PLC) y, de manera dependiente, a la proteína cinasa C (PKC); estimula la acumulación de fosfatidilinosítido y fosfatidilinositol fosforilado. Recientemente, la clonación de un receptor funcional ha permitido entender como este agonista activa a las plaquetas²⁰. La trombina tiene efectos sobre la interacción de plaquetas-células tumorales *in vitro* y en la metástasis *in vivo*²⁰ (Gráfica 3).

Presenta doble acción en la hemostasia: convierte el fibrinógeno en fibrina y adhiere a las plaquetas entre sí. La trombina induce la reacción de liberación e inicia la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas.

Las plaquetas presentan varios sitios de unión con la trombina. La ocupación de estos sitios por la trombina puede ser responsable para la activación de las plaquetas, debido a que la membrana plaquetaria presenta fibrinógeno, es lógico que la trombina sea el sustrato que regule esta agregación².

4) Colágena

La colágena induce la adhesión y la agregación plaquetaria, la secreción del ADP y activa el sistema troboxano-prostaglandina. Este es mediado por los receptores plaquetarios que difieren de aquellos involucrados en la adhesión a colágena debido a que sus fibras se requieren para la activación, mientras que la colágena monomérico sirve para la adhesión. Es así que las fibras de colágena sintetizan los endoperóxidos de prostaglandinas y TX A₂ 5,14,30,35.

In vitro, la colágena produce una sola onda de agregación irreversible; se inicia con un período de latencia ³⁰ (Gráfica 4).

5) Ristocetina

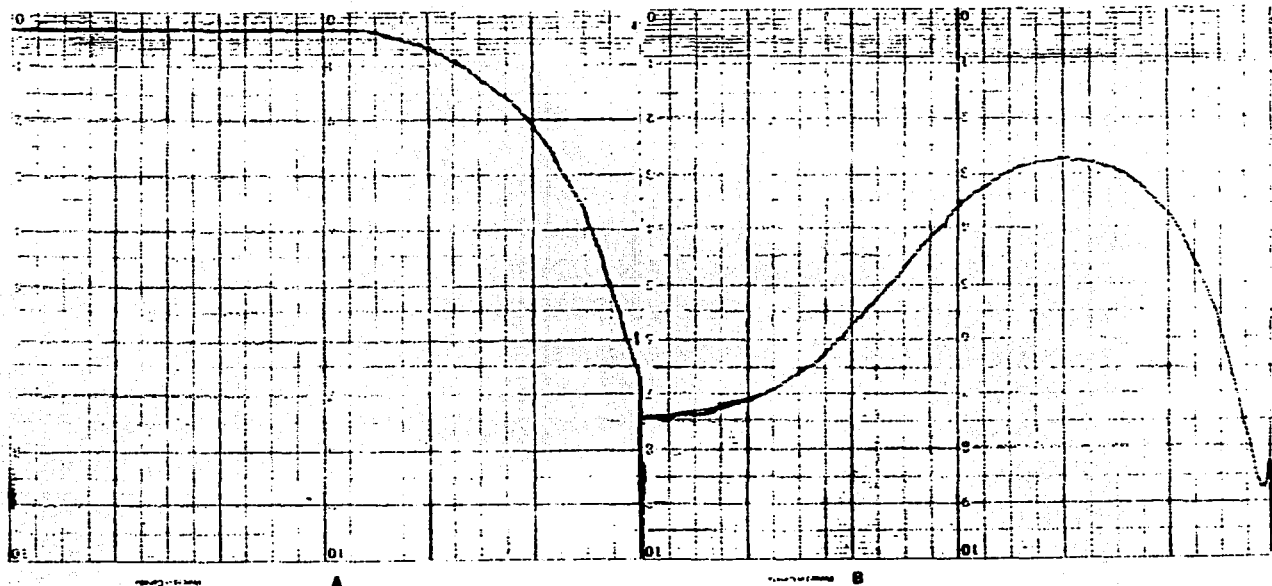
El ristocetín o ristocetina es un antibiótico derivado de la especie de actinomiceto *Nocardia lurida*. Está formado por dos compuestos: ristocetín A y ristocetín B; su estructura química está constituida de aminoácidos, carbohidratos y anillos aromáticos ³⁰. Fue introducido a la medicina clínica en los años 50's y suprimido por causar trombocitopenia, demostrándose más tarde su efecto agregante^{31,32}.

La ristocetina agrega a las plaquetas en PRP conteniendo el factor VIII y el factor von Willebrand liberado ³². En algunos pacientes con la enfermedad de von Willebrand no existe respuesta de agregación con el ristocetín, debido a la disminución o ausencia de un factor plasmático en pacientes con esta enfermedad³³.

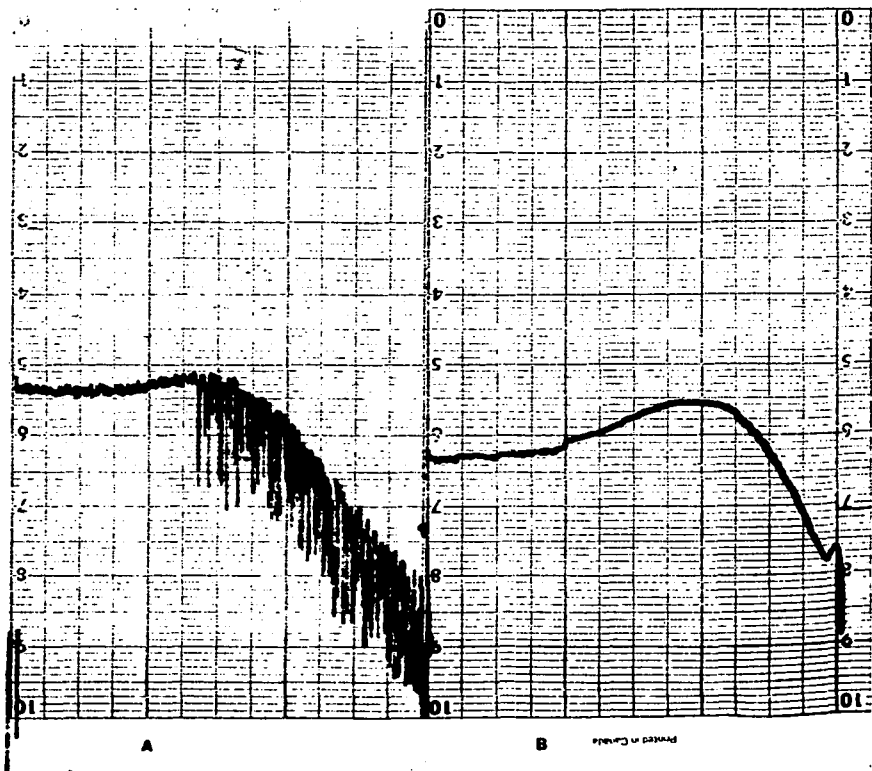
La agregación inducida por ristocetina se debe a la formación de enlaces intracelulares con péptidos dependientes del grupo sulfidrilo llamados enlaces "tiol", lo que sugiere que este agonista actúa directamente sobre la membrana plaquetaria y no sobre la plaqueta misma. Por lo tanto, la actividad de la ristocetina se debe a la unión con los triptéptidos C-terminal de los precursores mucopeptídicos de la pared celular bacteriana³².

La ristocetina posee una característica única como inductor ya que es el único que exhibe alteraciones de la enfermedad de von Willebrand. Por el contrario, en las trombastenias, las respuestas de agregación a la ristocetina es normal mientras que con ADP, colágena, trombina y epinefrina la respuesta es anormal³³. En la enfermedad de Berhard Soulier tampoco existe respuesta.

La ristocetina a concentraciones de 1500 $\mu\text{M}/\text{ml}$, presenta dos ondas de agregación donde la primera se encuentra fusionada con la segunda, siendo irreversibles debido a la liberación de ADP intrínseco³².



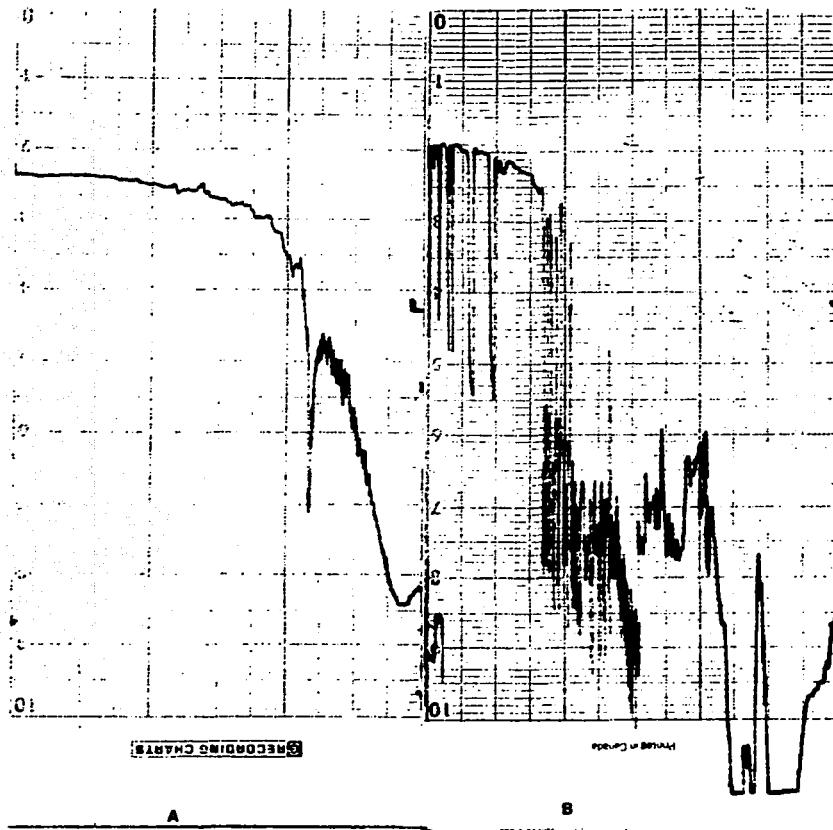
Gráfica 1. Ondas de agregación inducidas por ADP ($2.5 \mu\text{M/ml}$).
A) Sobre plasma humano: 1a. onda, normal; 2a. onda, ausente.
B) Sobre plasma de rata normal: 1a. onda, normal; 2a. onda, ausente.



Grafica 2. Ondas de agregación inducidas por epinefrina (250 μ M/ml).

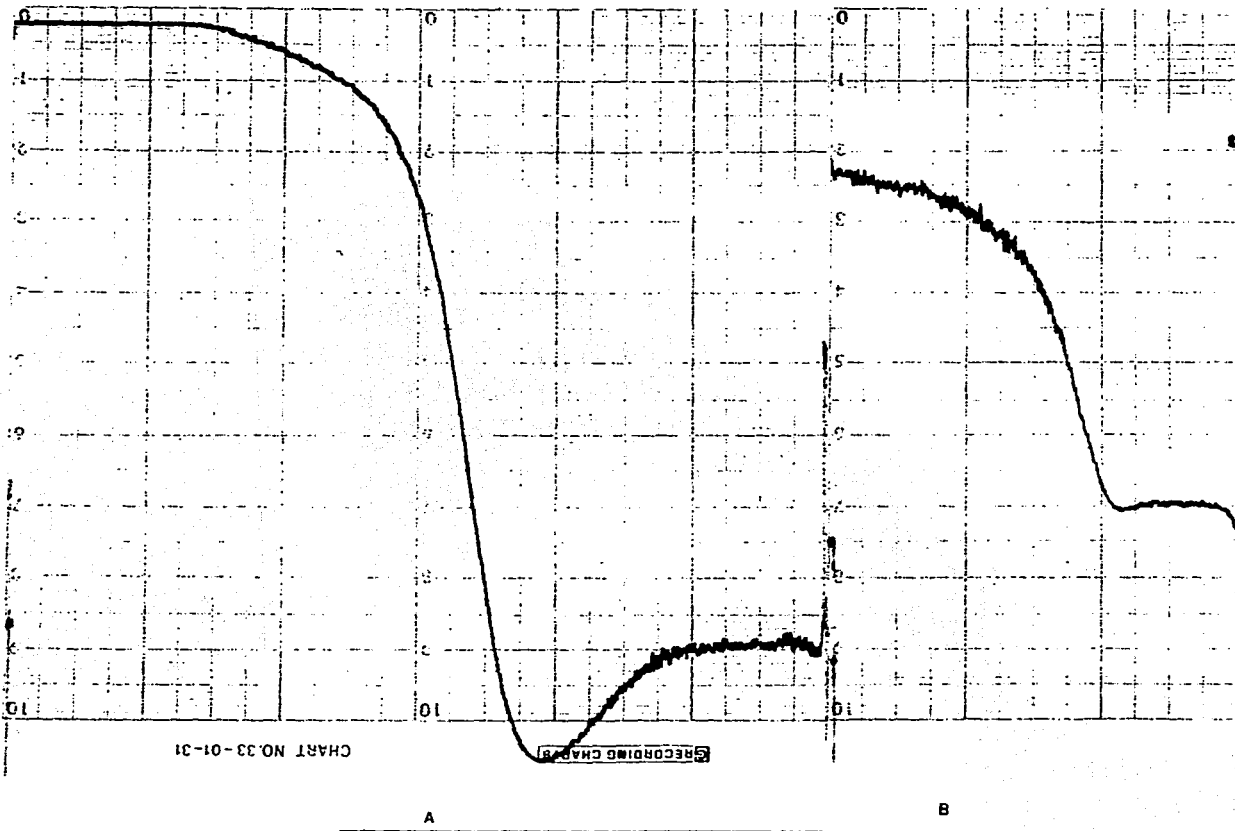
A) Sobre plasma humano: 1a. onda, normal disminuida, 2a. onda, ausente.

B) Sobre plasma de rata normal: 1a. onda, normal disminuida; 2a. onda, ausente.



Gráfica 8. Ondas de agregación inducidas por trombina (0.4 U/ml).
A) Sobre plasma humano: 1a. onda, normal; 2a onda, normal.
B) Sobre plasma de rata normal: 1a onda, normal; 2a. onda. normal.

FALLA DE ORIGEN



Gráfica 4. Ondas de agregación inducidas por colágena (10 μ M/ml).

A) Sobre plasma humano: 1a. onda, normal.

B) Sobre plasma de rata normal: 1a. onda, normal.

6) Fibrinógeno

El fibrinógeno se requiere como un cofactor para la agregación inducida por ADP^{18,22,34}. La superficie plaquetaria contiene receptores para el fibrinógeno que son expuestos después de la estimulación.

Se han identificado las regiones en las que el fibrinógeno se une a los receptores plaquetarios. El fibrinógeno está compuesto de tres pares de cadenas α , β y γ , arreglados en un dominio central y dos dominios laterales, por lo que la porción del grupo carboxi-terminal de las cadenas α y γ presentan, en los dominios laterales, unión sobre los receptores de la plaqueta.

El receptor del fibrinógeno está localizado sobre el complejo GP IIb/IIIa de la membrana y se une después de la activación, quizá por un cambio conformacional en el complejo¹⁸.

OTROS INDUCTORES

La vasopresina estimula la agregación mediante la unión al receptor del factor V_I sobre la superficie plaquetaria, el cual activa a la fosfolipasa C, inhibiendo al adenilato ciclasa.

El factor de activación plaquetaria, PAF, a concentraciones nanomolares, activa a las plaquetas por la unión de varios receptores de la membrana de alta afinidad. Este factor es sintetizado por neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, monocitos o células endoteliales.

La serotonina es un agonista débil a concentraciones micromolares. Interactúa con dos clases de receptores sobre la superficie plaquetaria.

El catión divalente conocido como ionóforo A23187 induce cambio de forma y estimula la agregación a través de la tercera ruta debido a la transferencia de calcio del medio externo en el citoplasma^{33,36}. Los efectos que produce el ionóforo son similares a los producidos por la trombina³⁶.

Los prostanoides, interactúan con los receptores que o activan a las plaquetas o estimulan el adenilato ciclasa, inhibiendo la respuesta plaquetaria y estimulando la formación de AMPc.

INHIBIDORES DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

El término antiagregante plaquetario (antiplaquetario o antagonista de la agregación plaquetaria) se emplean para designar una serie de sustancias (aminoácidos, vitaminas, anticuerpos, sustancias de origen natural y fármacos como antiinflamatorios, antibióticos, depresores, estimulantes, cardiovasculares, etc.) que tienen varias de las siguientes propiedades:

- a) Inhibición de la función plaquetaria como es la adhesión, agregación, etc. mediante técnicas *in vitro*.
- b) Determinación de productos secretados como serotonina y metabolitos de las prostaciclinas.
- c) Aumento de la supervivencia de las plaquetas marcadas con radioisótopos.
- d) Reducción de los agregados plaquetarios circulantes.
- e) Inhibición de la formación del trombo inducido por las plaquetas *in vivo*.

Se clasifican de acuerdo a su mecanismo de inhibición o de traducción de señales²⁰⁻²², 35-46.

GRUPO I - Los que interfieren con los receptores de la membrana.

Constituido por antagonistas que inhiben la agregación inducida por colágena y la segunda onda de agregación inducida por ADP. Se divide en tres subgrupos:

1. Inhibidores de la fijación de ADP y de la interacción del fibrinógeno con las glicoproteínas de la membrana, específicamente GP IIb/IIIa.
 - Ticlopidina.
 - Nifedipino, isradipino.
 - Equistatina.
 - Cocaína, procaina, xilocaina, reserpina.
 - Ketamina.
 - Anticuerpos monoclonales.
2. Inhibidores de la unión de la plaqueta al factor von Willebrand.
 - Ampicilina, carbencilina, gentamicina, piperazina, moxalactama.
 - Desipramina, nortriptilina, imipramina.
 - Propanolol, clofibrato, dihidroergotamina.
 - Alcohol, cicloheptadina, dextrano.
 - Sulfonilureas.
 - Frangulin B (*Rhamnus formosana*).

GRUPO II - Los que interfieren en el aumento de la concentración de AMPc.

Estos agentes incrementan los niveles de AMPc, inhibiendo muchas de las respuestas plaquetarias incluyendo la disminución de calcio intracelular, formación de tromboxano o la reacción de liberación. Se ha sugerido que el mecanismo es mediante la inhibición de la fosfolipasa C-ciclo del fosoinositido y de la movilización de calcio. Se divide en tres subgrupos:

1. Estimulantes de adenilato-ciclasa.

- Prostaciclina PGD₂ y PGE₁.
- Bloqueadores α -adrenérgicos: fentolamina, dihidroergotamina
- Nifedipino
- Hernandezina (*Thalictrum glandulosissimum*).
- Dicentrina (*Lindera magaphylla*).

2. Estimulantes de guanilato-ciclasa.

- Nitrovasodilatadores: L-arginina, óxido nítrico, nitroglicerina, etc.
- Insulina.

3. Inhibidores de la fosfodiesterasa.

- Metilxantinas: cafeína, teofilina, aminofilina.
- Dipiridamol.
- Papaverina.
- Triflusal.

4. Estimulantes de la liberación de prostaciclina.

- Nafazatrón.

GRUPO III - Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas (vía ácido araquidónico).

1. Inhibidores de la ciclooxigenasa. Inhiben la ciclooxigenasa y la síntesis de TXA₂, así como la liberación de ADP.

- Salicilatos: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, indometacina, sulfpirazona, diclofenaco.
- Triflusal.
- Furosemida.
- Hidrocloroquina.
- Vitamina E.
- Capsaicinas (*Capsicum sp.*).
- Ginsenósidos y panaxinol (*Panax ginseng*).

2. Inhibidores de los receptores de TX A₂ mediante la síntesis de TX A₂.

- Ácidos grasos omega-3(ácido eicosapentanoico).
- Ácido linoleico.

3. Bloqueadores de los receptores de TX A₂. Estos agentes inhiben el TX A₂, activando el adenilato-ciclase y estimulando la formación de AMPc.

- Furosemida, hidralazina.
- Verapamilo.
- Tocoferol.
- Prostanoides.
- *Cinnamomum philippinense*.

4. Inhibidores de la tromboxano sintetasa

- Imidazol y derivados.

5. Inhibidores de la fosfolipasa.

- Quinacrina.
- Hidrocortisona, metilprednisolona.

GRUPO IV - Inhibidores de antagonistas específicos.

1. Activadores e inhibidores de la proteinquinasa C. La proteína cinasa C, PKC, es una enzima de serina o treonina cinasa específica dependiente de calcio y fosfolípidos; es activada por 1,2-diacilglicerol.

- Esteres de forbol.
- Dafroretina.
- *Crotum tiglium*.

Por el contrario, la PKC se ve inhibida por agentes que inhiben la formación de 1,2-diacilglicerol:

- Poliaminas: putrescina, espermidina, espermina.

2. Inhibidores del factor de activación plaquetaria (PAF).

- Ginkgólido A, B, C (*Ginko biloba*).
- Prehispanolona (*Leonorus heterophyllus*).

3. Inhibidores de la trombina.

- Heparina.
- Dicumarol.
- Ajo (*Allium sativum*).
- Canela (*Cinnamon cortex*).

4. Inhibidores del ADP.

- Apirosa.
- Análogos estructurales del ADP: ATP, AMPc, adenosina.

5. Antagonistas de la serotonina.

- Ketanserina (bloqueo de los receptores 5_2 y HT_2).

6. Antagonistas de la adrenalina.

- Bloqueadores de los receptores α -adrenérgicos: ionbina y rauwolscina

7. Intervienen en la tromboestena.

- Vinblastina, vincristina, colchicina.

**ANORMALIDADES PLAQUETARIAS
EN DIABETES MELLITUS**

DIABETES MELLITUS

Enfermedad asociada con alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasa y proteínas, de origen multifactorial manifestándose, ya desarrollada en su totalidad, en hiperglucemia, glucosuria, aumento en la degradación de proteínas, cetosis, acidosis y aumento en el riesgo de enfermedades vasculares y cuya causa principal es la deficiencia absoluta o relativa de la secreción de la hormona insulina^{47,48}. Es decir, insuficiente en relación al aumento en la demanda de la hormona cuando su acción biológica es menor a lo normal.

Fue descrita muchos años antes de Jesucristo. En el año 1500 a.C., los egipcios describieron, en el papiro de Ebers, una enfermedad asociada con el exceso de orina. El médico griego Celsus reconoció la enfermedad pero no fue hasta el año 70 a.C. que otro médico griego llamado Arateo de Cappadocia la denominó *diabetes* (que en griego significa "discurrir a través de" o "atravesar").

Durante los siglos 3 al 6 d.C., los estudiantes chinos, japoneses e hindúes describieron un estado de salud con poliuria en el cual, la orina era dulce y pegajosa. Fue en el año 1674 que Thomas Willis observó que la orina diabética tenía un sabor parecido a la miel. El agregó el adjetivo *mellitus*, que en griego significa "miel". Cien años después, Dobson demostró que efectivamente el sabor dulce se debía al azúcar ingerida^{49,50}.

Las manifestaciones clínicas clásicas de la diabetes mellitus, poliuria y polidipsia, son consecuencia de la hiperglucemia, mientras que las manifestaciones crónicas que afectan a la mayor parte de los pacientes son el resultado del metabolismo anormal, tanto de la glucosa como de los lípidos y proteínas. Aunque la deficiencia puede mejorarse con la dieta, insulina intravenosa o agentes hipoglucemiantes orales, el tratamiento normal no ha evitado el desarrollo de complicaciones crónicas. Entre las manifestaciones crónicas más importantes están las que resultan del daño a los nervios (neuropatías), a los vasos sanguíneos pequeños (microangiopatías), tanto en riñones (nefropatías) como en la retina (retinopatías) y, las que son consecuencia de un proceso aterogénico acelerado (macroangiopatías)⁴⁷.

ETIOLOGIA

Es importante el papel de los factores de riesgo, aunque no todos son aceptados, ya que no son la causa directa de la diabetes, sino aquellos que son genética y ambientalmente susceptibles⁵¹.

- Herencia.
- Obesidad
- Defecto o daño en las células beta del páncreas.
- Alteración en los receptores de insulina.
- Factores de inmunidad y sistema HLA.
- Fármacos con efecto hiperglucemiantes.
- Estrés.
- Hábitos dietéticos y deficiencia nutricional.
- Infecciones virales.
- Susceptibilidad racial.
- Mutaciones puntuales en el gen que codifica a la insulina.

CLASIFICACION

En 1979, el Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América publicó una clasificación, a nivel internacional, sobre la diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa y comprende dos clases⁵³:

- 1) clase clínica.
- 2) clase de riesgo estadístico

Esta clasificación fue adoptada y modificada por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud en 1985⁵³ (Tabla 5).

1. Diabetes Mellitus, caracterizada ya sea por hiperglucemia en el ayuno o por niveles de glucosa plasmática por arriba de los límites definidos durante una prueba de tolerancia a la glucosa⁵⁴.

Esta clase se subdivide en cuatro tipos que parecen definir la categoría y patogénesis:

- a) Tipo I: dependiente de insulina (IDDM).
- b) Tipo II: no dependiente de insulina (NIDDM).
- c) Relacionada con la mala nutrición (MRDM).
- d) Otros tipos.

La diabetes tipo I y II son las principales formas clínicas en el mundo occidental, mientras que la diabetes relacionada con la mala nutrición es la principal causa en Asia, Africa y el Caribe. La diabetes tipo I se refiere a sujetos que dependen, de forma permanente, de insulina para controlar la hiperglucemia y prevenir la cetoacidosis. Su etiología está asociada a dos causas: factores genéticos y factores ambientales⁵⁴. La diabetes tipo II se caracteriza por la retención de secreción de insulina endógena, ausencia de cetoacidosis y resistencia a la insulina debido a la disminución de respuesta de las células blanco a la hormona^{53,54}. Dependen de agentes hipoglucemiantes orales, los cuales se seleccionan de acuerdo con la edad, estado cardiovascular, insuficiencia hepática y renal, embarazo o lactancia y alergias⁵⁵.

La diabetes mellitus relacionada con la mala nutrición puede llegar a ser de mayor incidencia que la tipo I e igual de frecuente que la tipo II. Es una subclase frecuente si se consideran a todos los habitantes del mundo.

Tabla 5. Clasificación de la Diabetes mellitus y otras categorías²³.

A) CLASES CLINICAS.

I Diabetes Mellitus

1. Tipo I - Dependiente de Insulina (IDDM).
2. Tipo II - No Dependiente de Insulina (NIDDM).
 - Obesos.
 - No obesos.
3. Relacionada con la nutrición.
 - Diabetes pancreática fibrocalcúlosa.
 - Diabetes relacionada con desnutrición con deficiencia proteica.
4. Asociada con otras condiciones o síndromes (Diabetes Secundaria).
 - Enfermedad pancreática.
 - Enfermedad de etiología hormonal.
 - Inducida por sustancias químicas o por fármacos.
 - Anormalidades de la molécula de insulina o sus receptores.
 - Ciertos síndromes genéticos.
5. Anormalidades de Tolerancia a la Glucosa (IGT).
 - Obeso.
 - No obeso.
 - Asociada con otras condiciones o síndromes.
6. Diabetes Gestacional.

B) CLASES DE RIESGO ESTADISTICO.

1. Anormalidad Previa de Tolerancia a la Glucosa (Prev AGT)
 2. Anormalidad Potencial de Tolerancia a la Glucosa (Pot AGT)
-

En la cuarta categoría se clasifican varias entidades que anteriormente fueron definidas como secundarias o asociadas con síndromes genéticos raros⁴⁷.

2. Anormalidad de tolerancia a la glucosa (IGT). Se refiere a que los niveles de glucemia de la curva normal de tolerancia a la glucosa están entre los límites de lo normal y los considerados diabéticos⁵².

3. Diabetes gestacional (GDM). Desorden en el cual la tolerancia a los carbohidratos se deteriora bajo el estrés metabólico del embarazo⁵⁴. Si una mujer diabética llega a embarazarse no entra en esta clasificación.

Existen además, dos clases de riesgo estadístico en donde se incluyen a individuos que en el pasado han tenido una alteración en la tolerancia a la glucosa o a los individuos que tienen una relación genética estrecha un un diabético y son: anormalidad previa de tolerancia a la glucosa y, anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa.

Diabetes experimental

Méndez y Ramos consideran que si se conoce la variación en la susceptibilidad de las especies animales hacia los agentes inductores de diabetes se podrá hacer una mejor selección del modelo, a la vez que se puede evitar la pérdida innecesaria de animales y la optimización de recursos en estudios futuros⁵⁷.

Por razones éticas en seres humanos no se permite la inducción de diabetes. El uso de animales representa enormes ventajas para el estudio de la diabetes ya que se puede disponer de varias generaciones para estudiarlas con cuidado y en tiempo bastante corto. La diabetes permanente en los animales también da oportunidad de estudiar la interacción de factores hereditarios y ambientales como dieta, fármacos, tóxicos, y agentes infecciosos.

Por regla general, cualquier nueva terapéutica para prevenir o revertir la enfermedad debe primero probarse en animales. Asimismo, las observaciones en estos pueden extrapolarse al hombre después de un análisis riguroso, como en el caso particular de la diabetes ya que la hiperglucemia como una característica universal pudiera no manifestarse de la misma forma que en el hombre.

Existen tres clases de agentes diabetogénicos: la primera clase está constituida por sustancias tóxicas que destruyen a la célula β causando un estado de deficiencia primaria de insulina (aloxana, estreptozotocina, tiourea, somatotropina, entre otras); la segunda clase está constituida por sustancias que actúan sobre la célula β pero no la destruyen. La última

clase está constituida por sustancias que incrementan los requerimientos endógenos de insulina debilitando el páncreas y como consecuencia se produce la diabetes (hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina, agentes quelantes como el zinc)⁶⁷.

La aloxana y la estreptozotocina son los agentes más utilizados para inducir diabetes siendo los mejores modelos de estudio para este síndrome el ratón y la rata. La aloxana es un derivado del ácido úrico, de fórmula empírica $C_8H_5N_3O_6$. Su mecanismo de acción es aún desconocido. Algunas evidencias indican que el efecto es mediado por una interacción a nivel de membrana de células beta. Otros estudios, utilizando aloxana marcada con ^{14}C revelan que existe gran afinidad de la sustancia por la membrana celular lo que ocasiona alteraciones en su permeabilidad, lo que explica, en parte, la reacción selectiva observada en estas células. Sus propiedades físicas de la aloxana son: soluble en agua, quelante de zinc, inhibidor de la hexocinasa y otras enzimas, inactivador de la coenzima A, libera tripsina de tejido exógeno y reacciona con la membrana de las células beta⁶⁷. Se cree que el efecto tóxico de la aloxana sobre la permeabilidad, transporte, rutas generadoras de energía y secreción insulínica sea debido a la formación de radicales libres.

La estreptozotocina, STZ, es un antibiótico extraído de *Streptomyces acromogenes* y preparado en forma altamente pura. Su fórmula empírica es $C_8H_{15}N_3O_7$ conteniendo una función N-nitrosometilamida⁶⁸.

Se ha demostrado que la acción diabetogénica de la STZ resulta principalmente de su alta y específica acción citotóxica sobre las células β con necrosis rápida e irreversible debido a que reduce el NAD celular en varios tejidos.

La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto por STZ como por aloxana. Ciertos carbohidratos protegen a un animal contra los efectos de la aloxana. La glucosa y, en menor grado la fructosa y manosa, cuando se administran antes de la aloxana, pueden prevenir o aminorar la hiperglucemia. El efecto protector de los carbohidratos se relacionaría con las propiedades estereoespecíficas, lográndose un mejor efecto con anómeros dextro⁶⁷.

Okamoto *et al* investigaron un concepto para el mecanismo uniforme y la acción de la aloxana y STZ. Consideraron la fragmentación del DNA de las células β como un evento crucial causado por acumulación de superóxido y radical $OH\cdot$ y/o alquilación (metilación) del DNA; las rupturas de las hebras son responsables del deterioro de la síntesis y secreción de insulina. Esto da inicio inmediato a los procesos de reparación que involucra la activación de poli(ADP-ribose)sintasa y el empleo asociado de NAD^{+} (Fig.8).

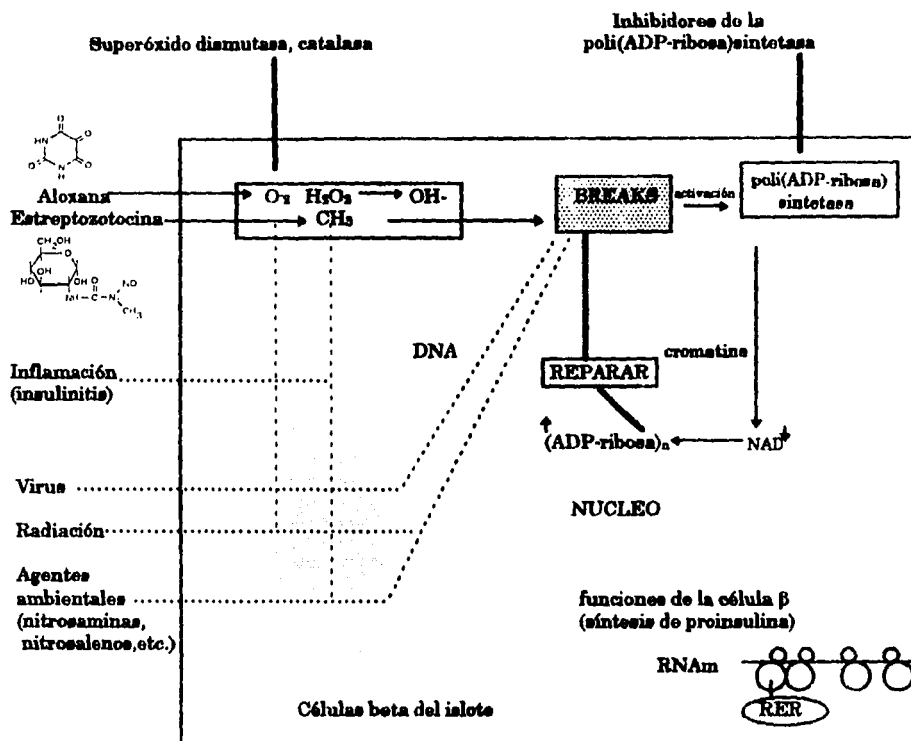


Figura 8. Mecanismo de acción de la aloxana y estreptozotocina.

Anormalidades hematológicas en Diabetes mellitus

En diabetes se producen una serie de alteraciones metabólicas que se traducen en un aumento en la frecuencia de enfermedades coronarias y vasculares periféricas así como hematológicas. De estas últimas destacan los cambios morfológicos y funcionales en los eritrocitos^{60,61}, leucocitos⁶² y plaquetas^{63,64,65}, así como la viscosidad plasmática y sanguínea⁶⁶, además de los cambios en las concentraciones de proteínas, lípidos y lipoproteínas⁶⁷.

Existen también desórdenes asociados con diabetes como es el caso anemias, discrasias sanguíneas o trombocitopenias^{68,69}. Las anomalías hematológicas conducen a una disminución en la oxigenación de los tejidos⁶⁸. Tabla 6.

Tabla 6. Anormalidades y desórdenes hematológicos asociados con diabetes

Leucocitos:

- Disminución de la quimiotaxis.
- Disminución de la diapedesis.
- Disminución de la fagocitosis.
- Disminución de la actividad bactericida.
- Disminución de la inmunidad celular.

Anemias:

- Por deficiencia de hierro.
- Anemia hemolítica.
- Anemia aplástica.

Discrasias sanguíneas:

- Leucemias.
- Linfomas.
- Mieloma múltiple.

Eritrocitos:

- Elevación en la agregación.
- Disminución en la deformación.
- Disminución de los receptores de insulina.

Plaquetas:

- Elevación en la adhesión.
- Elevación en la agregación (hiperagregación).
- Disminución en la fluidez de la membrana.
- Incremento en la liberación de β -tromboglobulina, PF-3 y PF-4.

Desórdenes en la coagulación:

- Incremento en los factores de coagulación (I, V, VII, VIII, XI, XII).
- Incremento en los niveles de fibrinógeno.
- Disminución de la actividad fibrinolítica.
- Trombocitopenia.

Sangre total:

- Elevación de la viscosidad plasmática y sanguínea.
 - Incremento en la glicosilación de hemoglobinas (no enzimática).
 - Incremento del sistema del complemento.
-

ANORMALIDAD PLAQUETARIA EN DIABETES MELLITUS.

En diabetes, las plaquetas presentan anomalías en su función lo que ha sugerido que la hiperactividad plaquetaria está involucrada en factores patogénicos de las complicaciones vasculares. Entre estos factores se encuentran: la alteración en el balance hemostático, anomalías en la función plaquetaria, incremento en la coagulación sanguínea, disminución de los anticoagulantes fisiológicos y alteraciones en el sistema fibrinolítico⁷⁰.

La asociación de las anomalías plaquetarias con la *Diabetes mellitus* y otras enfermedades vasculares sugieren un papel importante en la actividad plaquetaria. Los problemas vasculares en diabetes se manifiestan en dos formas: macroangiopatía o enfermedades macrovasculares (aterosclerosis prematura) y microangiopatía o enfermedades microvasculares (retinopatía y nefropatía). Los sujetos con retinopatía presentan disfunción plaquetaria, mientras que aquellos que presentan *Diabetes mellitus* no complicada presentan una función plaquetaria "casi" normal. En presencia de enfermedades vasculares como aterosclerosis coronaria, los sujetos diabéticos no presentan diferencias significativas debido a que la función plaquetaria puede estar alterada en ambos pacientes⁷¹.

De manera muy breve se describen los cambios en la morfología, función y composición que ocurre en las plaquetas cuando se presenta la diabetes.

El conteo plaquetario de individuos normales y/o diabéticos es de 250,000-500,000 plaquetas/ml. En rata el número es mayor, de 500,000 hasta más de 1,000,000 plaquetas/ml. No existen evidencias que demuestren algún incremento o disminución en el número de estas células, por tal motivo la cuenta plaquetaria no se considera útil en diabetes⁷².

En diabetes, las plaquetas sufren cambios en su forma, pasando de discoide a una forma esférica con dendritas (pseudópodos)⁷⁰. La fluidez de la membrana también se ve alterada haciendo más sensible a la plaqueta^{70a}. Esta alteración se refiere a una disminución en la fluidez, la cual está asociada con la hipersensibilidad a la trombina y a otros agonistas. La reducida fluidez de la membrana se relaciona con el grado de glicación y acetilación de las proteínas membranales⁷³, pero la proporción molar fosfolípido-colesterol no es elevada en estas membranas^{66,68}. Las proteínas plaquetarias de sujetos diabéticos están glicosiladas no enzimáticamente, en mayor grado, que en sujetos normales, produciendo también, una disminución en la fluidez de la membrana⁷³.

Las plaquetas presentan un incremento en la actividad de miosina-ATPasa sin presentarse cambios en la distribución de proteínas contráctiles. Asimismo, existe un incremento en la fosforilación endógena de proteínas plaquetarias⁶⁰. Los niveles de fosfolípidos y de ácidos grasos de la membrana plaquetaria son elevadas en presencia de diabetes, de igual manera los cambios en las concentraciones plasmáticas de estos lípidos pueden afectar la función plaquetaria. La acidosis diabética puede alterar la función de los ácidos grasos en la plaquetas.

Desde el punto de vista metabólico, son pocos los estudios realizados que relacionan la función plaquetaria y los cambios metabólicos en diabetes. Por ejemplo, la incorporación de glucosa *in vitro* a plaquetas diabéticas, estimula la incorporación de acetato en los ácidos grasos siendo que la incorporación únicamente de acetato en ácido láurico, mirístico o palmítico es poca. La actividad de la glucoamiltransferasa superficial es elevada, facilitando la adhesión plaqueta-colágena⁶⁴.

Estudios realizados por Song-yuan *et al*, ha demostrado que los niveles de AMPc plaquetario en diabetes se ven disminuidos y no tienen relación alguna con la síntesis de TX B₂⁷⁴.

La actividad de la ruta del araquidonato es elevada en diabetes, haciendo a las plaquetas hipersensibles. Esta actividad se refleja en los cambios de algunos mecanismos involucrados en la activación plaquetaria. Estudios realizados con plaquetas de rata diabética han demostrado un incremento en la formación de TX A₂, el cual es el responsable de un incremento en la movilización de araquidonato de los fosfolípidos de la membrana⁶⁶.

De igual manera, la síntesis y metabolismo de prostaglandinas presenta un incremento en su actividad, la cual puede controlar, parcialmente, la respuesta anormal de la agregación. Las plaquetas diabéticas tienen un incremento de sustancias similares a la prostaglandina E (PGE) en respuesta a los estímulos producidos por los diferentes agonistas^{42,66,75}. El papel principal de las prostaglandinas plaquetarias y endoteliales es de mantener la homeostasia y el tono vascular. El malondialdehído, un hiproducto de endoperóxidos, es un indicativo en la síntesis de prostaglandinas y sus niveles son elevados en diabetes. La generación de prostaglandinas y la agregación plaquetaria se correlacionan con la magnitud de niveles de malondialdehído⁷¹.

La producción plaquetaria de prostaciclina (PGI), inhibitoras de la agregación, se ve alterada en diabetes por lo que sus niveles disminuyen⁷¹.

Los cambios ocurridos en el metabolismo de ácido araquidónico sugieren un desequilibrio en la síntesis de TX A₂ y PGI₂; dichos cambios podrían acelerar el desarrollo de los cambios microvasculares que ocurren en diabetes. Los cambios en el metabolismo de PGI₂ pueden corregirse por un buen control en la diabetes mediante la relación que existe entre la glucosa sanguínea y los niveles de TXB₂⁶⁹.

Las proteínas y glicoproteínas plaquetarias son potencialmente más susceptibles a la glicación no enzimática. Como ya se mencionó, la glicación de proteínas ocasiona una disminución en la fluidez de la membrana, mientras que la glicación de glicoproteínas como el complejo IIb/IIIa puede ser responsable de la hiperagregación que presentan las plaquetas diabéticas^{70,70a,76}; los cambios que sufren las glicoproteínas son cambios físicos. La calmodulina (CaM) también está relacionado con este proceso a través de la regulación de la cadena de la miosina cinasa y mediante la desactivación de la óxido nítrico sintasa, que es Ca²⁺-CaM dependiente. En diabetes, una quinta parte de CaM es glicada, viéndose afectada la función plaquetaria⁷⁶.

En diabetes, los receptores plaquetarios también sufren cambios. Cuando las plaquetas son estimuladas con ADP, el complejo GP IIb/IIIa, receptor de fibrinógeno, y la GP Ib aumentan en número^{70a}; de igual manera, los receptores de fibrinógeno se ven incrementados. La hipersensibilidad de la trombina de plaquetas diabéticas, tanto humanas como de ratas, la cual ocurre a través de un mecanismo independiente de la activación de la ruta del araquidonato, podría estar involucrada en la alteración de los sitios de unión de trombina a su receptor o por un mecanismo postreceptor⁶⁶. La insulina incrementa el número de receptores plaquetarios en diabetes.

El tiempo de vida plaquetaria (sobrevivencia) es más prolongado en diabetes y esto puede deberse a una serie de factores tales como: actividad reducida de una ruta que altere a las plaquetas; una actividad reducida del sistema fagocítico mononuclear; y, la alteración en la producción de megacariocitos⁷⁷. En algunos estudios se ha observado que la vida de las plaquetas es reducida pero esto es, principalmente a la presencia de enfermedades vasculares más que a la diabetes^{70a}.

Función plaquetaria en diabetes

Existen una serie de factores que influyen en la función plaquetaria de sujetos y de animales diabéticos tales como la edad, sexo, terapia con insulina, niveles de glucosa plasmática, niveles de ácidos grasos y albúmina, factores plasmáticos, etc.

Aunque las plaquetas pueden contribuir a la generación de aterosclerosis y complicaciones tromboembólicas en diabetes, el papel de éstas en el desarrollo de enfermedades vasculares en diabéticos no es claro. Sin embargo, la función plaquetaria con o sin complicaciones vasculares presenta una serie de variables.

ADHESION. En diabetes, la adhesión plaquetaria es elevada. Diferentes estudios han demostrado que la elevada sensibilidad está relacionada con los niveles elevados del factor von Willebrand ya que este factor es producido por las células del endotelio vascular⁶⁸. Lógicamente, sujetos con enfermedades coronarias, diabéticos o no, presentan un incremento en la adhesión. La elevada adhesión puede disminuir después del tratamiento con hipoglucemiantes orales o con insulina⁶⁴.

La adición de glucosa *in vitro* incrementa la adhesión plaquetaria en sujetos y animales, sean o no diabéticos debido a que inducen la liberación de ADP de los gránulos^{64,66}.

AGREGACION. Las plaquetas diabéticas humanas o de animales presentan una hipersensibilidad a los distintos agentes agonistas *in vitro*, por lo que la agregación es muy elevada (hiperagregación); el incremento es observado en la segunda onda de agregación en respuesta al ADP, epinefrina, ácido araquidónico, colágeno o trombina^{68,69}. El aumento en la agregación en respuesta al ADP de la plaqueta de ratas diabéticas se lleva a cabo sin la activación de la ruta del araquidonato o sin que exista liberación de los gránulos⁶⁵. La trombina interactúa con los receptores plaquetarios activando a un nucleótido de guanina unido a proteínas, activando a la fosfolipasa C para originar 1,2-diacilglicerol, que a su vez activa a la proteína-quinasa C para fosforilar proteínas de elevado peso molecular⁶⁵.

Estudios realizados en ratas y conejos mencionan que existe un incremento en la adhesión y agregación cuando son tratados con aloxana o estreptozotocina y que probablemente se deba a las alteraciones en la viscosidad o del metabolismo^{78,79}.

En años recientes se ha demostrado que la agregación de plaquetas normales aumenta en presencia de eritrocitos diabéticos, lo cual puede deberse a una elevada hemólisis durante la agitación, la cual podría liberar grandes cantidades de ADP. El efecto de la insulina sobre la agregación plaquetaria parece estar mediado por los eritrocitos⁶⁹.

Como se ha venido mencionando, la agregación es dependiente de la ruta del ácido araquidónico, por lo que en sujetos diabéticos la síntesis de TXA₂ es mayor que la de sujetos normales.

La dieta de pacientes diabéticos enriquecida con ácido linoléico parece tener acción antagonista sobre la agregación. La sustitución de este ácido por otros ácidos grasos como el

oléico altera la función de la plaqueta⁶⁰. De igual manera, la dieta compuesta con aceite de pescado (ácido graso 3-omega) mejora la calidad de vida del paciente diabético. Su función es la de elevar la producción y liberación de óxido nítrico del endotelio el cual va a activar a la guanilato ciclasa para estimular al GMPc y producir vasodilatación, relajación del endotelio y, al mismo tiempo, inhibir la agregación⁶¹.

Los antiagregantes plaquetarios constituyen un grupo farmacológico cuyo auge e importancia adquiere día a día mayor consideración por la estrecha relación que existe entre la función plaquetaria y los mecanismos evolutivos de procesos cardiovasculares trombogénicos como aterosclerosis, diabetes o hiperlipidemia⁶². Fármacos como el ácido acetil salicílico (AAS) y derivados han demostrado una gran eficacia como antiplaquetarios. Actualmente el triflusal [ácido 2-acetiloxi-4-(trifluorometil)-benzoico], análogo al AAS, es un nuevo fármaco que es utilizado como antiagregante plaquetario; presenta un perfil farmacológico, farmacocinético y bioquímico distinto al AAS ya que su vía de síntesis es distinta y carece de actividad antiinflamatoria⁶³.

La insulina y los nitrovasodilatadores como el óxido nítrico, han demostrado efecto antiagregante en individuos y animales normales y diabéticos, tanto *in vitro* como *in vivo*^{64,65}.

SECRECIÓN. La liberación de material intraplaquetario de los gránulos en diabetes es elevada. El PF-4 y la β -TG, proteínas específicas contenidas en los α -gránulos, se encuentran en grandes concentraciones en el plasma. El PF-3, de actividad procoagulante, también se encuentra elevado^{66,68,70}. En ratas inducidas con STZ también existe un gran incremento en la liberación del contenido de los gránulos⁶⁶.

COAGULACIÓN. Entre los factores de coagulación y la función plaquetaria en diabetes existe un estado de hipercoagulación, habiendo un incremento en los factores I, V, VII, VIII, XI y XII^{64,65}. Con el incremento de la actividad coagulante, los inhibidores fisiológicos de la coagulación se ven disminuidos; es el caso de la antitrombina III, originando una deficiencia en la proteína C⁷⁰.

En ratas diabéticas, el efecto de la coagulación está acompañado por microtrombosis en los vasos y hemorragias en los tejidos. Este efecto puede ser reversible con la previa administración de insulina⁶⁵.

Es de gran interés el incremento que sufren los niveles de fibrinógeno, los cuales son importantes como factor de riesgo para las enfermedades isquémicas del corazón. El fibrinógeno es una de las proteínas plasmáticas que contribuyen a la viscosidad sanguínea; el incremento de esta proteína se asocia con el riesgo de aterosclerosis⁷⁰.

Las glicoproteínas plasmáticas como la β -lipoproteína, ceruloplasmina y α_2 -macroglobulina presentan niveles elevados en diabetes. Este grupo se conoce, junto con el fibrinógeno, como "reactivas de fase aguda" ⁷⁹.

El sistema fibrinolítico (plasminógeno-plasmina) también ha sido evaluado en diabetes. Su actividad es disminuida, en parte, por la glicación del plasminógeno haciéndose menos susceptible a la activación. Bajo condiciones fisiológicas, la actividad fibrinolítica del endotelio puede ser modulada por varias rutas, 2 de las cuales se alteran cuando se presenta diabetes: una es la reacción de la trombomodulina-proteína C; la otra involucra a lipoproteínas ⁷⁰.

En resumen, los cambios en los componentes hemostáticos y en el sistema fibrinolítico no sólo puede originar riesgos tromboembólicos elevados en pacientes diabéticos, sino que son importantes en la patogénesis de las complicaciones vasculares, incluyendo aterosclerosis y microangiopatía. (Tabla 7).

Tabla 7. Principales características y cambios en la función plaquetaria en diabetes⁶⁰.

Características	Cambios
Forma	Discoide; esférica con pseudópodos (dendritas).
Número	Normal.
Sobrevivencia	Normal a elevado.
Receptores	Elevado el número de receptores de fibrinógeno. Elevado el número de moléculas de GP IIb/IIIa. Elevado el número de receptores de trombina. Elevado el número de receptores de insulina.
Fluidez de la membrana	Disminuida, asociada con la hipersensibilidad a trombina.
Fosfolípidos	Elevados.
Proteínas	Elevadas.
Glicoproteínas	Glicación de la GP IIb/IIIa. Cambios físicos (elevado peso molecular).
Prostaglandinas	Incremento en su actividad y síntesis. Elevada actividad en la ruta del araquidonato. Disminución de la sensibilidad a las prostaglandinas. Síntesis elevada de TX A ₂ Elevados niveles de TX B ₂ . Elevados niveles de malondialdehído. Disminuidos.
Niveles de AMPc	Fosfolipasa A ₂ , elevada.
Enzimas	Del ácido araquidónico, disminuidas. Arginasa, disminuida.
Adhesión	Glucosiltransferasa superficial, elevada.
Activación	Elevada; disminuye después del tratamiento.
Agregación	Elevada. Elevada en respuesta a varios agonistas (hiperagregación).
Liberación	Relación con micro- y macroangiopatía.
Agregación de plaquetas circulantes	Niveles elevados de β -TG, PF-3 y PF-4.
Coagulación plasmática	Elevada. Incremento en los factores de coagulación. (I, V, VII, VIII, XI y XII). Disminución de los inhibidores fisiológicos.
Glicoproteínas plasmáticas	Niveles elevados de β -lipoproteína, ceruloplasmina, α_2 -macroglobulina.
Fibrinógeno	Elevado; importante como factor de riesgo.
Sistema fibrinolítico	Disminución de la actividad fibrinolítica. Disminución del factor activador del plasminógeno. Alteración de las rutas trombosmodulina-proteína C y I de la lipoproteína. Disminución de la antitrombina III.

INSULINA

La insulina es la hormona principal que regula el metabolismo de los carbohidratos ⁸⁴. Es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, como respuesta a un aumento en la concentración de glucosa y aminoácidos en la sangre ⁸⁶. Tiene por objeto controlar el transporte de la glucosa desde el torrente sanguíneo hasta las células donde es oxidada mediante cinco transportadores (GluT) cuyos mecanismos son específicos; se enumeran de acuerdo al orden de su descubrimiento⁸⁶:

GluT1: Expresado en grandes niveles en las células endoteliales que cubren los vasos sanguíneos y forman una barrera entre el cerebro y la sangre.

GluT2: Se encuentra en órganos que liberan glucosa en la sangre como intestino, hígado, riñón y células beta del páncreas.

GluT3: Se encuentra en las neuronas.

GluT4: Principal transportador en músculos y células grasas.

GluT5: Se encuentra en pequeñas proporciones en intestino y riñón; su función aún no ha sido demostrada.

Químicamente, la insulina es una proteína pequeña cuyo peso molecular es de 5808, compuesta por 51 aminoácidos que forman dos cadenas polipeptídicas: la cadena A o glicina (por poseer glicina en el extremo) formada por 21 aminoácidos y, la cadena B o fenilalanica (por poseer fenilalanina en el otro extremo) compuesta por 30 aminoácidos. Ambas cadenas están unidas entre sí por tres puentes disulfuro, uno dentro de la unidad A y los otros dos entre ambas unidades ^{84,87}. Debe señalarse que los puentes disulfuro son esenciales ya que la ruptura de dicho enlace por reducción, suprime la actividad de la insulina. La insulina es destruida por enzimas proteolíticas como la pepsina y quimiotripsina, inactivándose en el tracto digestivo si se administra por vía oral ⁸⁴.

La insulina, como todas las proteínas, se sintetiza en los ribosomas, en la superficie del retículo endoplásmico de las células beta o a partir de los aminoácidos respectivos, los cuales forman un precursor insulínico denominado proinsulina, que es un polipéptido espiral (constituido de 84 aminoácidos y con un peso molecular de 9600) y que se desdobra por acción proteolítica en insulina y péptido conector C, eliminándose 4 aminoácidos esenciales en las posiciones 31, 32, 64 y 65 ^{87,88}. (Fig.9).

La glucosa que pasa a la sangre causa secreción rápida, que a su vez determina la captación, almacenamiento y uso de la misma por todos los tejidos del organismo, especialmente hígado, músculo y tejido graso. Una de los efectos más importantes de la insulina consiste en que la glucosa absorbida se almacena casi de inmediato en el hígado en forma de glucógeno. Cuando no se dispone de insulina y la concentración de glucosa en

sangre comienza a disminuir, el glucógeno hepático es convertido de nuevo en glucosa que se libera otra vez a la sangre evitando que la glucemia disminuya excesivamente⁸⁶.

Cuando la glucemia comienza a disminuir hasta un valor bajo, el hígado libera glucosa a sangre circulante ocurriendo dos fenómenos:

- El páncreas disminuye la secreción de insulina, deteniéndose el depósito de glucógeno.
- La falta de insulina activa a la enzima fosforilasa que desdobra el glucógeno en fosfato de glucosa el cual es transformado por la fosfatasa, en glucosa libre.

La acción hipoglucemiante de la insulina es equilibrada por la acción de las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis y corteza suprarrenal; la hormona de crecimiento estimula la secreción de insulina pero un exceso puede causar hiperglucemia.

La insulina tiene acción sobre diferentes células a nivel de receptores; su acción la lleva a cabo sobre células "blanco", por la interacción de receptores específicos de la membrana, como es el caso de los monocitos, adipocitos y hepatocitos⁸⁹, eritrocitos y plaquetas¹⁴. Utilizando insulina marcada ¹²⁵I o con insulina fluoresceína-isotiocianato, se ha demostrado la presencia de sitios de unión plaquetaria; el número de receptores se ha determinado que es de 25 sitios/ μm^2 por plaqueta. La interacción de la insulina con sus receptores podría activar diferentes rutas intraplaquetarias.

Las plaquetas son blancas para la acción de la insulina debido ya que presentan un receptor de insulina bien caracterizado capaz de fosforilar a la subunidad beta; debido a que la insulina modifica la respuesta plaquetaria hacia los agonistas que interactúan con diferentes receptores y activan diferentes rutas intracelulares, se cree que la hormona influye en algunos mecanismos básicos de la agregación plaquetaria⁴⁴.

La insulina tiene efecto antagonista sobre la agregación plaquetaria. El mecanismo es mediado por un incremento de GMPc intracelular que se encuentra en el citosol plaquetario, reduciendo la respuesta de agregación. El mecanismo antagonista es igual al que realiza la L-arginina, el óxido nítrico y otros nitratos orgánicos, es decir, mediante la estimulación de guanilato ciclasa soluble, que es quien incrementa los niveles de GMPc⁴⁴. La activación de la guanilato ciclasa por insulina podría ser mediada por los receptores de insulina que se encuentran sobre la superficie plaquetaria^{14,44}. La insulina no tiene efecto directo sobre la PLC ni sobre el TXA₂, pero sí sobre el 1,2-DAG el cual activa a la proteína cinasa C.

La L-arginina interviene en la secreción de insulina inducida por proteína ejerciendo la liberación de insulina y óxido nítrico, inducida por glucosa⁹⁰.

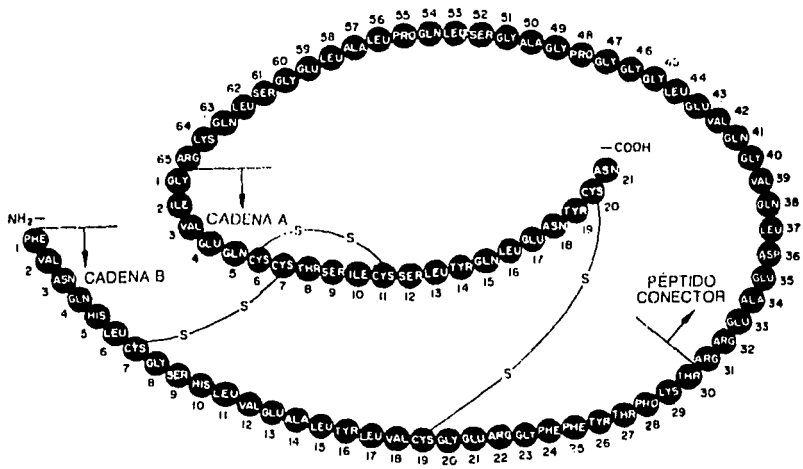


Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana. Por rompimiento proteolítico son eliminados cuatro aminoácidos (31,32,64 y 65) y el péptido conector, convirtiéndose así la proinsulina en insulina.

De acuerdo a los estudios de Schmidt *et al* existe la posibilidad de que el óxido nítrico y los nitrovasodilatadores exógenos liberen insulina de las células beta por la estimulación de la guanilato ciclasa, lo cual ha sugerido ser un mediador en la secreción de insulina. La regulación de insulina por L-arginina ha sido reportada como deficiente en pacientes no insulino dependientes pero no en pacientes insulino dependientes; de esta manera, las alteraciones de la ruta oxidativa de la L-arginina pueden participar como un mecanismo de patogénesis en *Diabetes mellitus*⁹⁰.

L-ARGININA

La L-arginina (ácido α -amino-5-guanidin-valerianico) es un aminoácido alifático, considerado como semiesencial ya que puede ser sintetizado por los mamíferos y aves pero no en cantidades suficientes para su máximo desarrollo, por lo que se requiere en la dieta para mantener los niveles adecuados en el organismo, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo para mantener una síntesis activa de proteínas y para realizar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos⁹¹.

La L-arginina se metaboliza mediante dos mecanismos complementarios:

- Hidrólisis enzimática, que ocurre por acción de la enzima arginasa no sólo en el ciclo de la urea sino también en tejidos extrahepáticos y que llevan a la formación de ornitina y urea.
- Descarboxilación oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico utilizándose en la síntesis de creatinina y de otros productos con gran actividad biológica.

La L-arginina sigue varios destinos metabólicos por lo que sus niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte del aminoácido por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y páncreas. Por ser un aminoácido glucogénico, se oxida a glutamato y éste, por oxidación produce α -cetoglutarato, un intermediario en la síntesis de glucosa (Fig.10).

Junto con L-glicina y L-metionina, L-arginina participa en la síntesis de creatinina, que es un compuesto clave para el almacenamiento de grupos fosfato en forma de fosfocreatinina en músculos y nervios. Interviene en la concentración de DNA ya que forma parte de las histonas y proteínas junto con la L-lisina, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan mayor cantidad de L-arginina. La función del aminoácido en las proteínas es el de dar carga positiva a pH neutro para poder combinarse con el DNA diplohelicoidal cargado negativamente, dando lugar a complejos DNA-histona, los cuales son una manera de unir la cadena de DNA en células eucarióticas.

Se ha demostrado que la L-arginina estimula la producción de insulina, interviniendo en la biosíntesis de ésta ya que forma parte del péptido C en los residuos 31, 32 y 65, los cuales son sitios donde se desarrolla la hidrólisis con tripsina para la liberación de insulina⁶². Se cree que el potasio causa la liberación de insulina abriendo los canales de calcio sensibles a los cambios de voltaje. La L-arginina cierra estos canales de las células alfa estimulando la producción de insulina e inhibiendo el glucagon. La liberación de insulina también se debe a la carga positiva no específica y a los efectos del pH⁶⁰.

Es posible que la L-arginina sea metabolizada dentro de las células beta ya que se ha comprobado que en los islotes de Langerhans transplantados de hígado de rata, este aminoácido estimula la producción de insulina. La secreción de insulina estimulada por L-arginina es de la misma naturaleza que la estimulada por la glucosa⁶³.

La respuesta de la insulina a la L-arginina disminuye con la edad y es independiente al secretagogo utilizado. Lo anterior se relaciona con la actividad de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa y al aumento en la producción del estado diabético⁶⁴.

En grandes cantidades (>500mg/g peso corporal), la L-arginina produce daño en el páncreas, los cuales incluyen la desorganización progresiva y degeneración del retículo endoplásmico rugoso de las células acinarias, así como una reducción en el número de zimógenos observados⁶⁵.

Interviene en la biosíntesis de poliaminas por medio del ciclo de la urea; la L-arginina es hidrolizada por la enzima arginasa, formando urea y ornitina; además, incrementa la actividad de arginasa y la formación de putrescina en el páncreas de ratas normales y diabéticas inducidas con aloxana⁶⁶.

La L-arginina tiene acción antagonista sobre la agregación plaquetaria. Uno de los primeros estudios fueron los realizados por Salzman y Chambers en los que mencionaban que la inhibición se debía a que el grupo α -amino era bloqueado o sustituido por grupos metil éster. Estos derivados de L-arginina, benzilarginina metil éster (BAME) o tocoilarginina metil éster (TAME) inhibían de manera eficiente la agregación si el grupo carboxilo era sustituido por un éster o una amida y si el grupo α -amino se encontraba libre o bloqueado. Estos estudios concluyeron que ni la L-arginina por sí sola ni el grupo guanidino podían inhibir la agregación inducida por ADP⁶⁷.

Actualmente se sabe que el efecto antiagregante *in vitro* se debe a la formación de óxido nítrico mediante un mecanismo conocido como ruta de la L-arginina/óxido nítrico⁹⁷⁻⁹⁹ donde el óxido nítrico es sintetizado a partir de los átomos de nitrógeno del grupo guanidino en las células endoteliales⁹⁸⁻¹⁰¹.

El mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo la inhibición de la agregación plaquetaria por L-arginina es el siguiente: las plaquetas poseen un grupo guanilato ciclasa soluble, el cual, cuando es activado y mediante un "feedback" negativo, induce un incremento en los niveles de GMPc (el cual es un segundo mensajero de neurotransmisores y hormonas) en el citosol plaquetario. Esta estimulación es dependiente de NADPH y Ca^{2+} y está asociada con la formación de óxido nítrico. El óxido nítrico intraplaquetario formado es el responsable de la inhibición de la adhesión y agregación⁹⁸⁻¹⁰²; por ser una molécula lipofílica penetra con facilidad la membrana plasmática formando un complejo con el grupo hemo de guanilato ciclasa soluble. El complejo óxido nítrico-hemo es quien activa a la enzima para incrementar los niveles de GMPc. Es probable que el nucleótido ejerza su acción afectando la fosfolipasa C (PLC) y disminuyendo la concentración de calcio intracelular⁹⁸ (Fig. 11).

Aunque la agregación plaquetaria humana es inducida por colágena e inhibida por el aminoácido, ambas inducen un incremento en los niveles de GMPc^{97,99}.

El efecto antiagregante de la L-arginina es potenciado por las prostaciclina y por un inhibidor selectivo de la GMPc fosfodiesterasa, el 2-O-propoxifenil-8-azapurin-6-ona (M&B 22948) que bloquea la hidrólisis del nucleótido¹⁰²⁻¹⁰⁵.

La síntesis de óxido nítrico se lleva a través de la acción de una enzima soluble dependiente de calcio, la óxido nítrico sintasa (NOS, E.C.1.14.13.39), la cual es activada cuando las plaquetas son estimuladas, con la subsecuente formación de L-citrulina^{98,106}. La óxido nítrico sintasa puede ser inhibida por N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA)^{98,99,106,107}. Recientemente se ha demostrado que esta enzima puede ser de dos tipos 1) constitutiva (eNOS), depende de cadmodulina y se encuentra en células endoteliales y en el cerebro; 2) inducible (iNOS), la cual está expresada en macrófagos, hepatocitos, células de los túbulos renales, etc.^{107a,107b}.

El óxido nítrico ha sido identificado como el factor relajante derivado del endotelio (FRDE) que además de su efecto relajante sobre las células vasculares del músculo liso^{106,108,109}, inhibe la formación de trombos, produce vasodilatación y se ha visto que es regulador normal de la erección del pene¹⁰⁸. Vasta *et al* identificaron un sistema de transporte para la L-arginina sobre plaquetas humanas, las cuales captan al aminoácido mediante un sistema de transporte de alta afinidad, cuyo comportamiento es similar al del Ca^{2+}

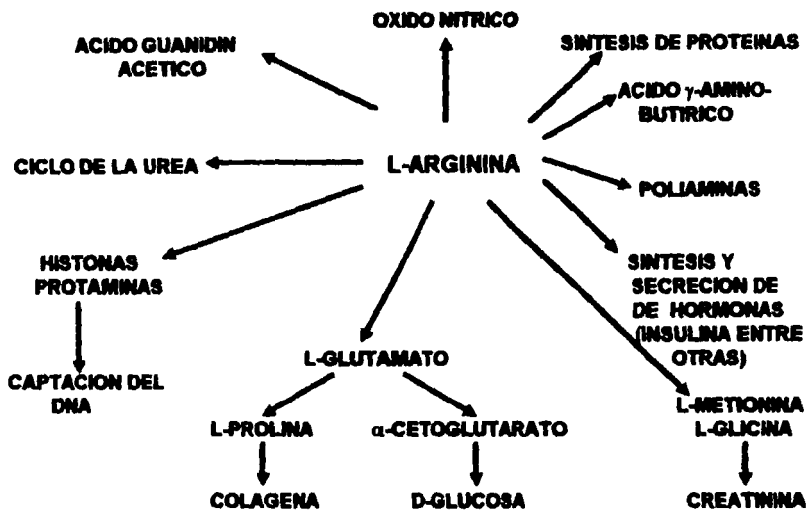


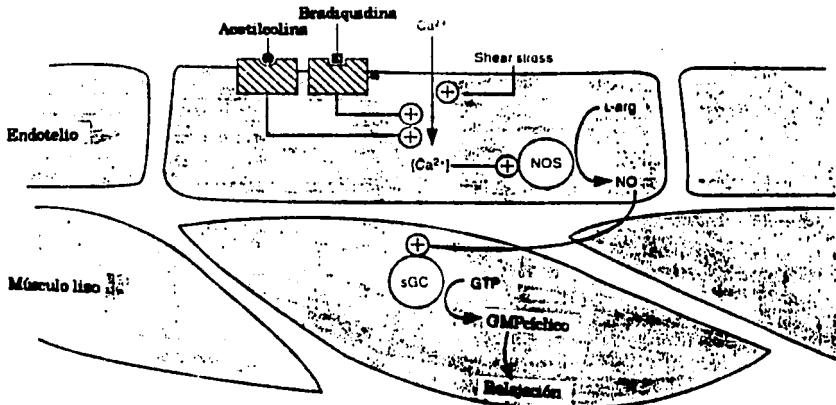
Figura 10. Destinos metabólicos de la L-arginina.

dio extracelular y el cual es inhibido por los aminoácidos catiónicos^{109a}.

ARGINASA

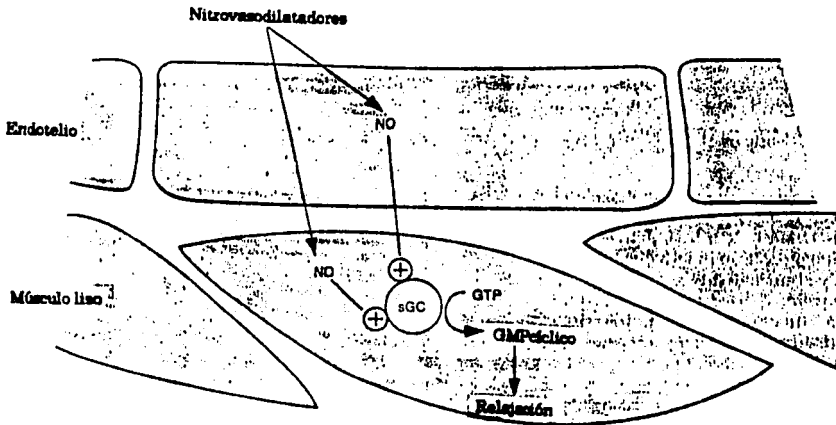
La arginasa (L-arginina aminohidrolasa, E.C. 3.5.3.1) es la enzima terminal del ciclo de la urea que cataliza la hidrólisis de L-arginina para formar L-ornitina y urea, y detectada inicialmente en el hígado de mamíferos¹¹⁰ en la actualidad se ha demostrado su presencia en otros tejidos como riñón, testículo, bazo, páncreas, placenta, sangre, suero, eritrocitos, linfocitos y, recientemente en plaquetas y células espermáticas¹¹¹.

En animales, esta enzima existe en la fracción soluble del citoplasma y en las diversas estructuras celulares como mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi y posiblemente en el núcleo.



A

Fisiología



B

Farmacología

Figura 11. Mecanismo de acción del óxido nítrico sobre la fisiología (A) y farmacología (B) del endotelio. Por la activación de un receptor del endotelio vascular por bradiquinina o acetilcolina se produce una entrada de calcio, el cual incrementa dentro de la célula para estimular a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El óxido nítrico formado a partir de la L-arginina estimula a la enzima guanilato ciclasa soluble, resultando un incremento sobre la síntesis de GMPc, produciendo una relajación en el endotelio y la inhibición de la agregación en las plaquetas¹⁰⁰.

FALLA DE ORIGEN

Esta enzima requiere la presencia de un catión divalente como el ion Mn^{2+} para su actividad. Para la arginasa se han identificado diversas formas moleculares, isoenzimas, las cuales presentan diferencias en algunas propiedades básicas como movilidad electroforética, solubilización y sensibilidad al calor.

Además de la fracción hepática donde participa en el ciclo de la urea, la actividad de la arginasa está asociada con la regulación de diversos procesos celulares como la biosíntesis de poliaminas donde facilita la disponibilidad de L-ornitina. Puede tener una función esencial en la síntesis de proteína pancreática. La participación de la enzima en esta biosíntesis a través de las poliaminas puede representar parte del mecanismo para la regulación de la biosíntesis y secreción de insulina⁹⁴.

POLIAMINAS

Las poliaminas son moléculas catiónicas alifáticas, no protéicas, de bajo peso molecular, presentes en células eucarióticas, unidas covalentemente a ácidos nucleicos por lo que pueden ser removidas por medio de hidrólisis ácida ligera. De estas, la putrescina, la espermidina y la espermina constituyen el grupo de poliaminas que más ha sido estudiado¹¹².

Las poliaminas cumplen una función importante en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento y proliferación celular, multiplicación y diferenciación; estabilización de membranas celulares y de partículas subcelulares; catálisis y control de la biosíntesis de ácidos nucleicos; efectos sobre la síntesis de proteínas; efecto sobre varias reacciones metabólicas e inhibición de la agregación plaquetaria¹¹³.

Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, aminoácidos o proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivos, lo que quizá sea un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular¹¹³. Las poliaminas están presentes en tejidos de mamíferos y fluidos corporales unidos covalentemente con proteínas, por ejemplo, formando enlaces bis-(α -glutamil)espermidina¹¹⁴.

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos en una concentración aproximada de 1 mM, mientras que la putrescina está presente en concentraciones bajas, excepto en tejidos que están estimulados al crecimiento o que tienen un comportamiento celular proliferativo como es el caso de la médula ósea¹¹³⁻¹¹⁶. En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y espermina^{112,113}.

Los niveles intracelulares de poliaminas, particularmente espermina y putrescina, aumentan espectacularmente con el crecimiento tanto en células normales como neoplásicas.

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y espermina, de las células animales; su síntesis es a partir de la L-ornitina, sin embargo, en las células vegetales superiores en bacterias y hongos la putrescina se obtiene a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de la L-arginina¹¹⁵.

Síntesis de poliaminas.

La mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas se localizan en el citosol. En mamíferos, la ornitina descarboxilasa (E.C. 4.1.1.17) cataliza el paso inicial de la biosíntesis. Esta enzima transforma la ornitina en putrescina; la espermidina y espermina se forman a través de la putrescina y espermidina, respectivamente por la transferencia de un residuo de propilamina aportado por la S-adenosilhomocisteamina. Estas reacciones están catalizadas por la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa, espermina y espermidina sintetas^{113,116,117} (Fig. 12).

La L-ornitina necesaria para la síntesis de poliaminas proviene del plasma, además de que puede formarse por acción de la arginasa a partir de L-arginina, como lo demuestra el hecho de que durante el aumento en la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de arginasa¹¹³.

Las poliaminas se encuentran en altas concentraciones en los islotes pancreáticos. Su presencia está restringida en la producción de insulina en las células beta y se ha encontrado que están asociadas con los gránulos secretores. *In vitro*, la glucosa no sólo estimula la biosíntesis de L-ornitina sino también de putrescina. Se ha demostrado que las poliaminas pueden actuar como sustratos para las transglutaminasas y como moduladores de las proteína-quinasas¹¹⁸.

La espermina y espermidina son capaces de antagonizar los efectos de la heparina sobre los canales de calcio y la actividad ATPasa dependiente de calcio de las vesículas del retículo endoplásmico y vesículas derivadas del sistema tubular denso de las plaquetas¹¹⁹.

La biosíntesis de poliaminas es necesaria para la proliferación y diferenciación de células hematopoiéticas adultas, principalmente las de la serie granulocítica. En rata, la inhibición de la biosíntesis de poliaminas con difluorometil-ornitina (F₂MeOrnt) tiene efectos sobre su sistema hematológico como el acelerado crecimiento de las células hematopoiéticas

progenitoras. Son esenciales para un cuidado apropiado de los elementos celulares de la sangre circulante¹²⁰.

La fosfolipasa C (PLC) es responsable de iniciar la reacción de liberación de ácido araquidónico; es reducida en un 50% de su actividad original por la presencia de poliaminas en células sanguíneas de pacientes con fibrosis quística, psoriasis, linfoma o leucemia por lo que las poliaminas incrementan el tiempo de sangrado en estos pacientes, produciendo una disminución de la liberación de ácido araquidónico para la subsecuente biosíntesis de tromboxanos y endoperóxidos de prostaglandinas. Esto se debe al desplazamiento de iones calcio de los sitios de unión de la PLC. La espermina inhibe a la PLC por un mecanismo no competitivo con respecto al calcio, lo que significa que la interacción de esta poliamina no es en el sitio donde se ve afectada la actividad enzimática, sino que actúa como inhibidor competitivo con respecto al fosfatidilinositol¹²¹.

Las poliaminas tienen un efecto antagonista sobre la agregación plaquetaria inducida por diferentes agentes agonistas. La espermina además de inhibir la agregación inducida por colágena, inhibe la liberación de serotonina; inhibe la agregación inducida por trombina mediante dos mecanismos: 1) interfiere en la unión de trombina con sus receptores plaquetarios y/o 2) interfiere en el paso de unión de la trombina, la cual está involucrada en el proceso de acoplamiento. Además, la espermina tiene como mecanismo de acción el de inhibir la PLC y a la PKC⁴².

El efecto antagonista de las poliaminas es mediante la inhibición de la PKC ya que se ve inhibida la formación de 1,2-DAG.

Las poliaminas son mejores inhibidores de la agregación plaquetaria que las aminas primarias y su efecto incrementa conforme aumenta la longitud de la cadena alifática, es decir:

espermina > espermidina > putrescina

La inhibición de la secreción inducida por trombina es debido a la inhibición de la formación de 1,2-DAG. y a la movilización de calcio, ya que ambos son importantes mediadores de la secreción de los gránulos densos^{42,121}.

Rehse *et al* ha presentado 11 derivados lipofílicos de pequeñas aminas biogénicas así como 28 derivados de poliaminas (tri- y tetraaminas) de las cuales 23 de éstas presentan acción inhibidora de la agregación plaquetaria inducida por colágena^{121a}. Otras oligoaminas hidrofílicas tales como la RE 1888 y la RE 1492, han demostrado también efectos antagonistas sobre la agregación plaquetaria e inhibición de la peroxidación de lípidos^{121b}.

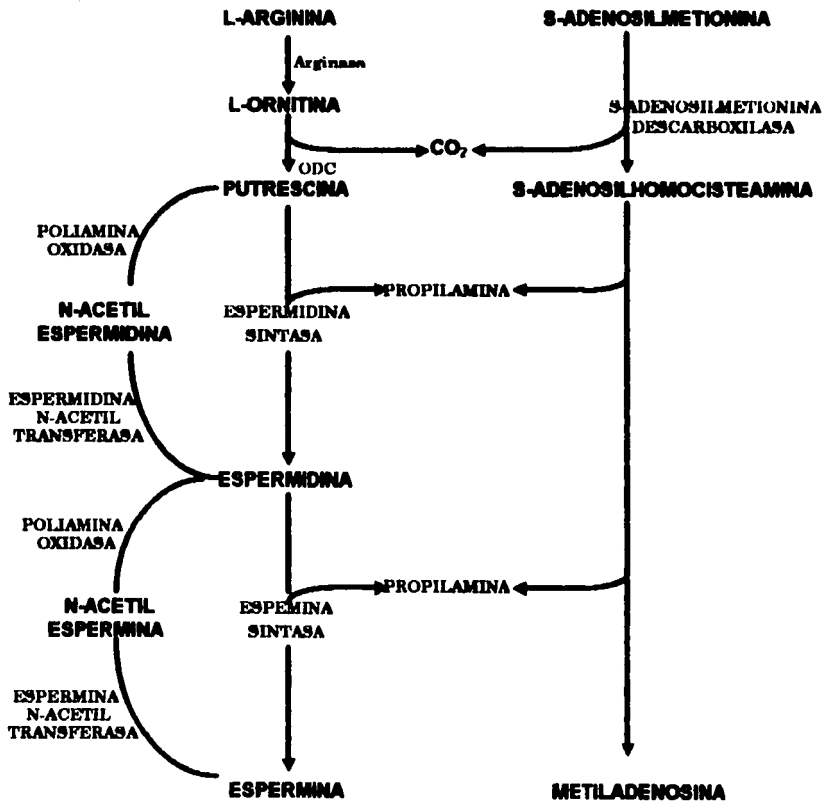


Figura 12. Biosíntesis de poliaminas.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO

ANIMALES

Se emplearon 180 ratas macho de la cepa *Sprague Dawley* con un peso aproximado de 310±50 g. mantenidas en un bioterio en condiciones adecuadas de alimentación, temperatura e higiene.

MATERIAL QUÍMICO E INSTRUMENTAL

Inducción de diabetes

Para la inducción de diabetes se utilizó monohidrato de aloxana (Sigma Chem.Co. Cat.No. A-8128).

Determinación de glucosa sanguínea

Para la determinación de glucosa sanguínea se utilizó un kit conteniendo el reactivo de glucosa oxidasa (Boehringer Mannheim Cat.No. 105 139).

Determinación de lípidos

Para la determinación de lípidos se utilizó un kit para lípidos totales (Merck Diagnostic Art.No. 3321).

Determinación de triacilglicéridos

Para la determinación de triacilglicéridos se utilizó el reactivo para triglicéridos del grupo Trinder (Sigma Diagnostics Cat.No. T-7661).

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma Chem.Co. Cat.No. F-9252) y albúmina bovina (fracción V, Sigma Chem.Co. Cat.No. A-4503).

Actividad de arginasa

Para la determinación de la actividad de arginasa se utilizó estándar de urea (Sigma Chem.Co. Cat.No. U-4128), tiocemicarbasida (Sigma Chem.Co. Cat.No. T-7625), diacetil monoxima (Sigma Chem.Co. Cat.No. B-0753), Trisma[®]HCl (Sigma Chem.Co. Cat.No. T-1503), cloruro de manganeso tetrahidratado (Sigma Chem.Co. Cat.No. M-3634), glicina (Sigma Chem.Co. Cat.No. G-7126), L-arginina (Merk & Co. Art. 1542).

Pruebas de agregación plaquetaria

Para las pruebas de agregación plaquetaria se utilizó ADP anhidro (sal de sodio, Sigma Chem.Co. Cat.No. A-0127), epinefrina (Sigma Diagnostics Cat.No. A-885-5), trombina humana (Ortho Diagnostic System, Code 731200), insulina isófana bovina NPH de acción intermedia (Eli Lilly & Co.), L-arginina (Merck & Co. Art. 1542), diclorhidrato de putrescina (Sigma Chem.Co. Cat.No. P-7505), triclóridrato de espermidina (Sigma Chem.Co. Cat.No. S-2501) y tetraclorhidrato de espermina (Sigma Chem.Co. Cat.No. S-2876).

Para la agregación plaquetaria se empleó un agregómetro Bryston® para medir la transmitancia de luz adaptado a un registrador Chrono-Log (Linear Instrument Corp.) para graficar las lecturas.

Determinaciones colorimétricas

Las determinaciones colorimétricas se hicieron con un espectrofotómetro DU®64 (Beckman).

METODOLOGIA

Los animales de experimentación se dividieron en dos grupos. El primer grupo fue de ratas normales mientras que al segundo grupo se les indujo diabetes mediante la administración de una solución de aloxana a una dosis de 120 mg/Kg de peso, preparada en solución salina al 0.9% vía intraperitoneal. Esto produce un estado diabético por daño específico a las células beta pancreáticas, produciéndose hiperglucemia a las 96 hrs, encontrándose los niveles más altos de glucosa en suero. En respuesta a este estudio, los animales presentaron poliuria, polidipsia, niveles de glucosa en sangre total mayor a 360 mg/dl, pelo erizado y pérdida de peso.

La muestra de sangre se extrajo vía bifurcación de la aorta (fig. 13) y se colectó en tubos de ensaye conteniendo anticoagulante citrado (citrato de sodio 3.8%, pH 6.3) en un volumen de 900 µl para rata normal y 1 ml para rata diabética, para obtener un volumen final de 8 ml. Los animales fueron previamente inyectados con 0.4 ml de droperidol (Dehidrobenzoperidol®) y 0.6 ml de ketamina (Ketaclor®). Se debe mencionar que las jeringas se preparaban con una parte de anticoagulante para evitar la coagulación de la sangre.

Las pruebas de agregación plaquetaria se realizaron de acuerdo al método de Born¹²³.

Las determinaciones de glucosa, lípidos totales, triglicéridos, proteínas y actividad de arginasa se realizaron mediante las técnicas de Trinder¹²⁴, Frings *et al*¹²⁴ y Knigh *et al*¹²⁵, Wahlefeld¹²⁶, Lowry *et al*¹²⁷ y Kung *et al*¹²⁸, respectivamente.

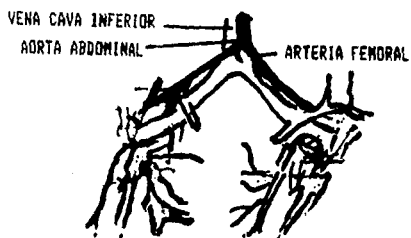
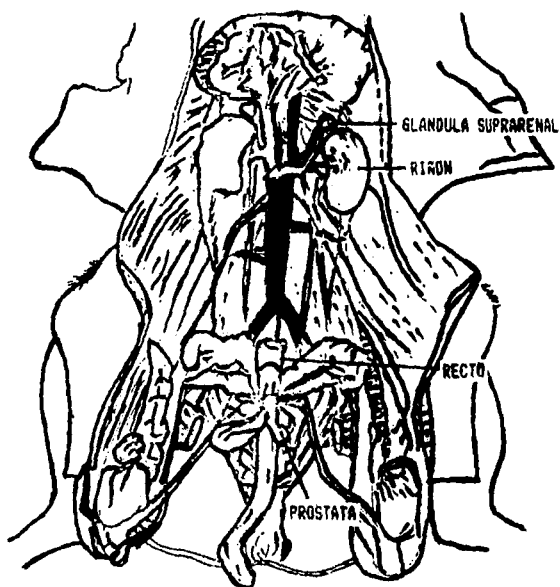


Figura 13. Esquema del sistema circulatorio de la rata.

FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS

1) Niveles de glucosa, triglicéridos y lípidos totales

Después de las 96 hrs. de la inducción de diabetes con aloxana, el peso de las ratas fue más bajo que el de las ratas normales (de 425.61 ± 13.01 a 253.04 ± 17.86 ; $\text{media} \pm \text{D.E.}$, $P < 0.05$).

En la determinación de glucosa encontramos una elevación muy marcada en el grupo de ratas diabéticas, encontrándose los niveles más elevados a las 96 hrs. después de la inducción. (Tabla 8).

En la determinación de triglicéridos se observó una marcada elevación en el grupo diabético a partir del segundo día, encontrándose los máximos valores entre los días 3 y 4, mientras que con la concentración de lípidos totales encontramos que el grupo de ratas diabéticas presenta un incremento desde el primer día, alcanzándose la máxima concentración a las 96 hrs. (Tabla 8).

2) Actividad de arginasa plaquetaria

La actividad de arginasa tanto en plaquetas humanas como de ratas normales fue mayor comparada con la actividad de las plaquetas de rata con diabetes inducida.

3) Agregación plaquetaria en plasma de rata normal

La agregación plaquetaria inducida por ADP ($2.5 \mu\text{M}/\text{ml}$) fue inhibida tanto por L-arginina ($10 \mu\text{M}$) como poliaminas ($10 \mu\text{M}$) e insulina ($10 \text{U}/\text{ml}$); el efecto antiagregante es dependiente de la concentración. La agregación plaquetaria no fue mayor del 50%.

La espermidina fue la poliamina que presentó el mejor efecto antiagregante en presencia de ADP (Tabla 10, gráficas 5 y 5a).

La agregación inducida por epinefrina ($250 \mu\text{M}/\text{ml}$) fue inhibida sólo por L-arginina ($10 \mu\text{M}$) y poliaminas ($10 \mu\text{M}$) pero no por insulina. La agregación plaquetaria para el caso de los 4 primeros antagonistas no fue mayor del 50%.

La insulina no presentó efecto antiagregante debido a su elevada concentración ($10 \text{U}/\text{ml}$) sobre epinefrina. La L-arginina fue el antagonista que mejor inhibió la agregación plaquetaria inducida por epinefrina (Tabla 10, gráficas 6 y 6a).

El mejor efecto antiagregante de la L-arginina (10 μ M), poliaminas (10 μ M) e insulina (10 U/ml) fue sobre trombina (0.4 U/ml) en plaquetas de rata normal. Para el caso de los cuatro primeros antagonistas, la agregación no fue mayor del 15%, teniendo el mejor efecto la L-arginina; la insulina presentó una agregación no mayor del 42%. Esto se debió a la elevada concentración utilizada sobre los plasmas (Tabla 10, gráficas 7 y 7a).

Se estudió únicamente el efecto de la trombina (4 U/ml) sobre plaquetas de rata con diabetes inducida debido a que, tanto el agente diabetogénico como el anestésico, alteraron la función plaquetaria tanto in vivo como in vitro.

Tanto la L-arginina (10 μ M) como la poliaminas (10 μ M) tuvieron un efecto antiagregante menor, esto se debe a que cuando se presenta diabetes la agregación plaquetaria es mayor y más rápida (hiperagregación), teniendo el mejor efecto la L-arginina.

La insulina no inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina en plaquetas de rata diabética debido a la elevada concentración utilizada (Tabla 11, gráficas 8 y 8a).

Tabla 8. Promedio \pm D.E. de la concentración de glucosa, triglicéridos y lípidos totales en el suero de ratas normales y diabéticas.

	Ratas normales	Ratas diabéticas
Glucosa (mg/dl)	132.5 \pm 2.6	543.3 \pm 16.9*
Triglicéridos (mg/dl)	62.0 \pm 8.2	823.0 \pm 6.1*
Lípidos totales (mg/dl)	231.8 \pm 19.6	1134.7 \pm 30.3*

Cada valor corresponde al promedio \pm D.E. de 4 determinaciones.

La diabetes se indujo con 120 mg de aloxana por Kg de peso.

*La diferencia es significativa con respecto a los controles ($P < 0.01$).

Tabla 9. Actividad de arginasa en plaquetas humanas y de ratas normales y diabéticas.

	Plaquetas humanas	Plaquetas rata normal	Plaquetas rata diabética
Cuenta plaquetaria (plaquetas/ml)	750,000*	950,000*	1,000,000*
Concentración de proteínas totales (mg /10 ⁶ plaquetas)	2.1121 \pm 0.144	1.7583 \pm 0.110	2.2563 \pm 0.138
Actividad de arginasa (amoles urea/mg proteína/min).	0.1280 \pm 0.011	0.1163 \pm 0.024	0.0783 \pm 0.006

Los valores representan el promedio \pm D.E. de 3 determinaciones.

*El conteo plaquetario se realizó por duplicado.

Tabla 10. Efecto antiagregante de L-arginina, poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) e insulina sobre tres diferentes agonistas en plasma de rata normal.

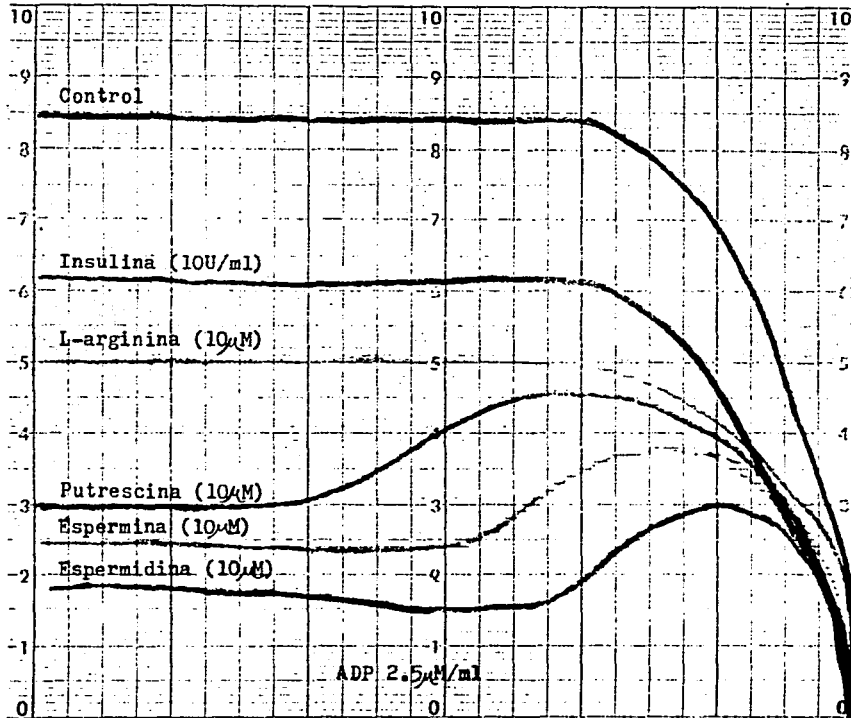
Agonista	Control	L-arginina (10 μ M)	Putrescina (10 μ M)	Espermidina (10 μ M)	Espermina (10 μ M)	Insulina (10 U/ml)
ADP (2.5 μ M/ml)	86.75 \pm 7.34	37.95 \pm 4.97	36.06 \pm 4.19	15.00 \pm 2.31	21.50 \pm 1.83	47.63 \pm 2.99
Epinefrina (250 μ M/ml)	83.00 \pm 5.60	15.50 \pm 3.22	26.25 \pm 3.53	28.19 \pm 5.01	28.75 \pm 4.42	75.62 \pm 10.09
Trombina (0.4 U/ml)	91.50 \pm 4.10	5.79 \pm 5.28	9.16 \pm 4.82	14.45 \pm 3.08	12.50 \pm 4.42	41.31 \pm 2.74

Cada valor representa el porcentaje de agregación y corresponde la promedio \pm D.E. de 6 determinaciones.
La diferencia es significativa ($P < 0.01$).

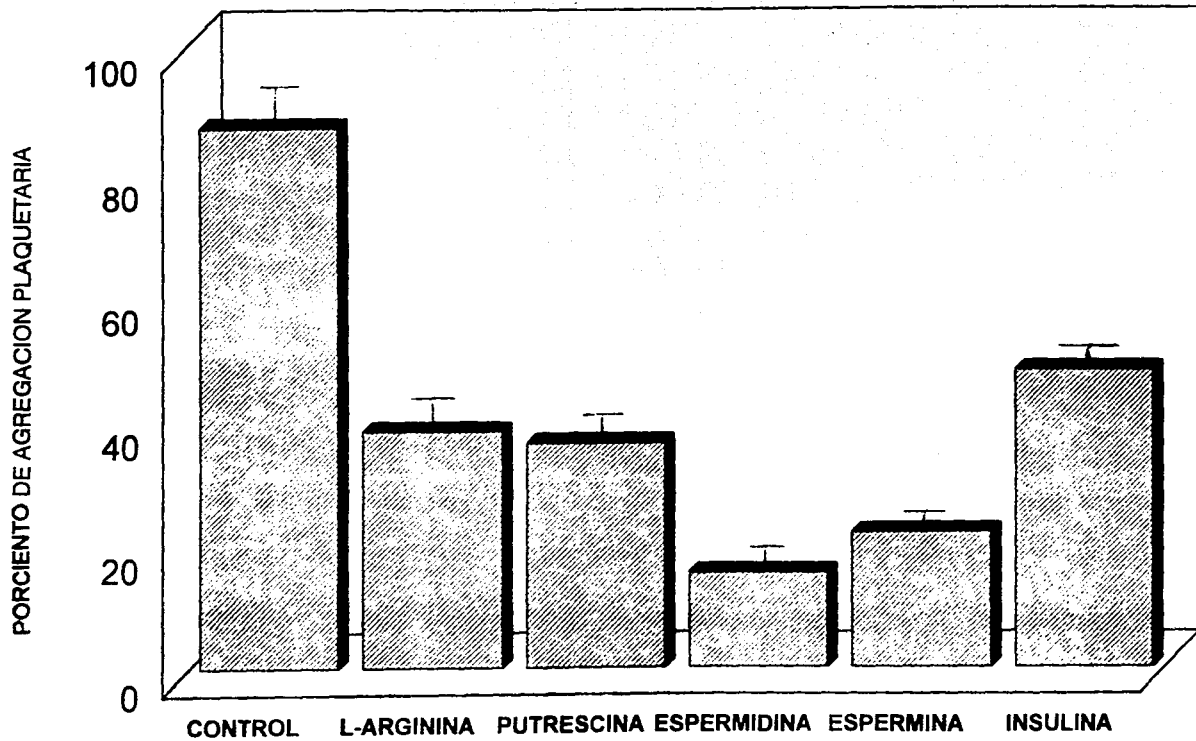
Tabla 11. Efecto antiagregante de L-arginina, poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) e insulina sobre trombina como agonista en plasma de rata diabética.

Agonista	Control	L-arginina (10 μ M)	Putrescina (10 μ M)	Espermidina (10 μ M)	Espermina (10 μ M)	Insulina (10 U/ml)
Trombina (4 U/ml)	90.3 \pm 3.21	22.4 \pm 2.27	34.95 \pm 3.37	40.31 \pm 1.96	38.1 \pm 4.16	84.12 \pm 1.99

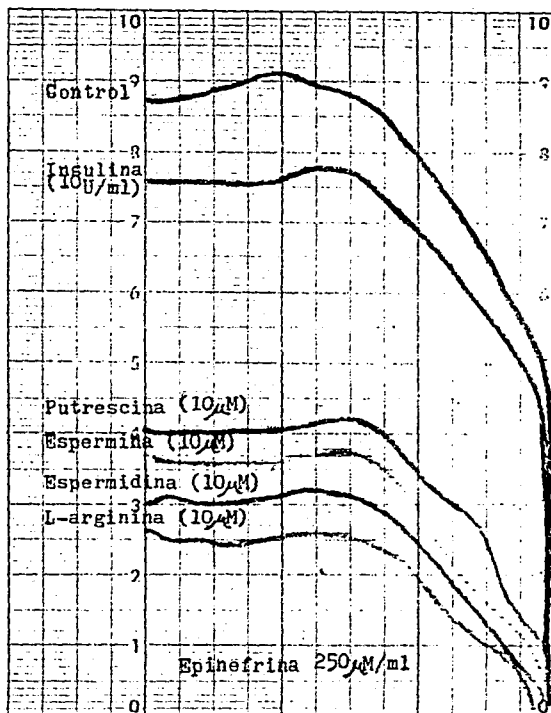
Cada valor representa el porcentaje de agregación y corresponde la promedio \pm D.E. de 6 determinaciones.
La diferencia es significativa ($P < 0.01$).



Gráfica 5. Efecto antiagregante de L-arginina y poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) comparado con el de la insulina, sobre la agregación inducida por ADP (2.5 μM/ml), en plaquetas de rata normal.



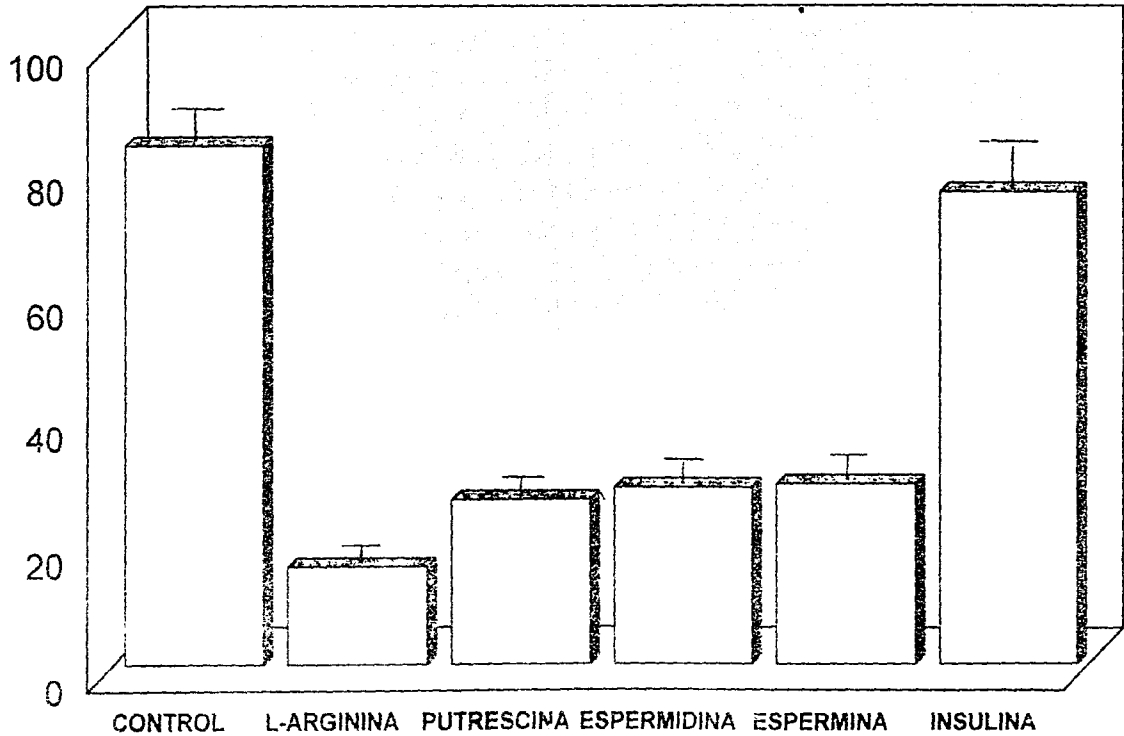
Gráfica 5a. Efecto de L-arginina (10 μ M), poliaminas (putrescina, espermidina, espermina, 10 μ M) e insulina (10 U/ml) sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP (2.5 μ M/ml).



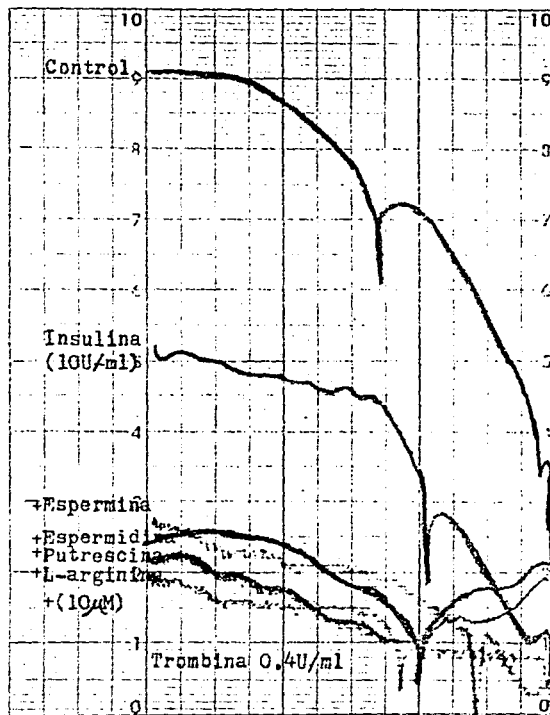
Gráfica 6. Efecto antiagregante de L-arginina y poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) comparado con el de la insulina, sobre la agregación inducida por epinefrina (250 µM/ml), en plaquetas de rata normal.

FALLA DE ORIGEN

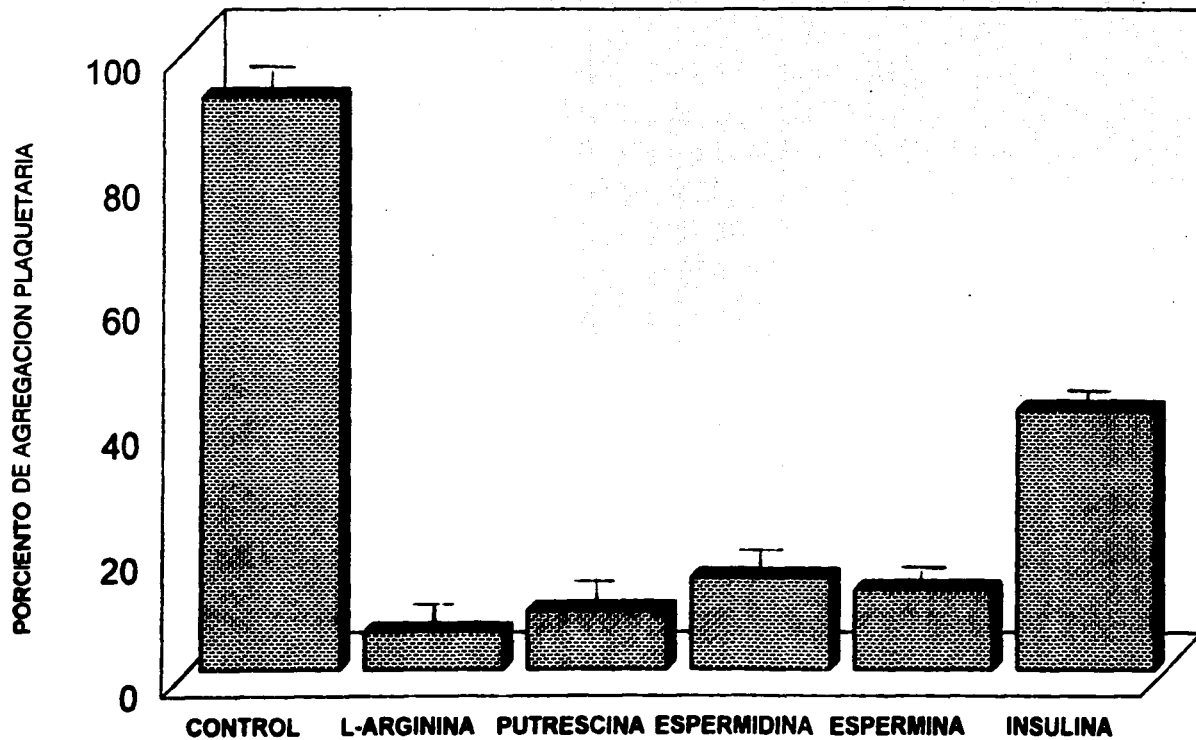
PORCIENTO DE AGREGACION PLAQUETARIA



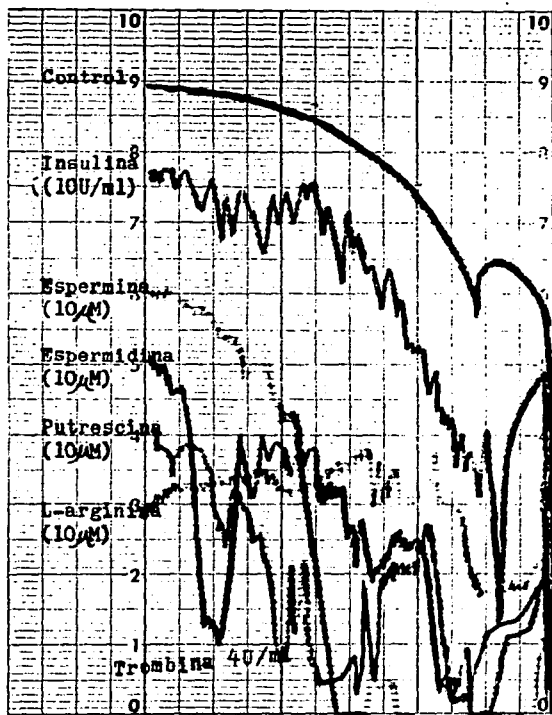
Gráfica 6a. Efecto de L-arginina (10 μ M), poliaminas (putrescina, espermidina, espermina, 10 μ M) e insulina (10 U/ml) sobre la agregación plaquetaria inducida por epinefrina (250 μ M/ml).



Gráfica 7. Efecto antiagregante de L-arginina y poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) comparado con el de la insulina, sobre la agregación inducida por trombina (0.4 U/ml), en plaquetas de rata normal.

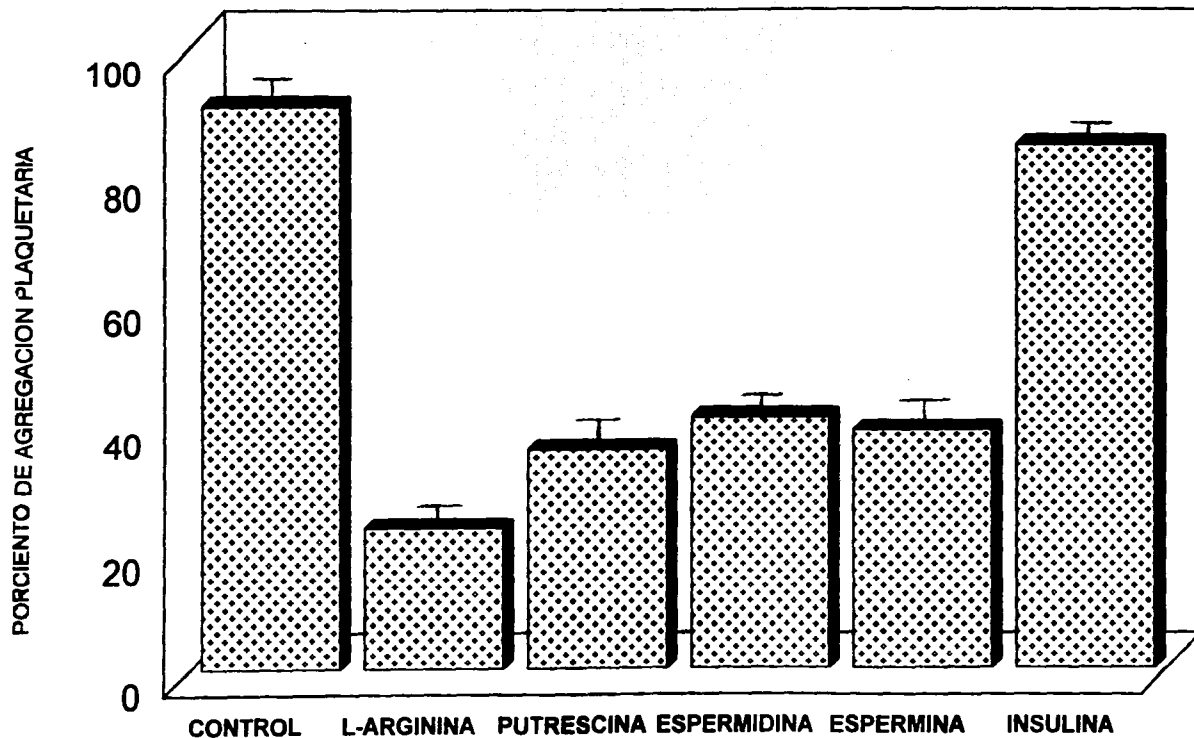


Gráfica 7a. Efecto de L-arginina (10 μ M), poliaminas (putrescina, espermidina, espermina, 10 μ M) e insulina (10 U/ml) sobre la agregación plaquetaria inducida por trombín (0.4 U/ml).



FALLA DE ORIGEN

Gráfica 8. Efecto antiagregante de L-arginina y poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) comparado con el de la insulina, sobre la agregación inducida por trombina (4 U/ml), en plaquetas de rata diabética.



Gráfica 8a. Efecto de L-arginina (10 μ M), poliaminas (putrescina, espermidina, espermina, 10 μ M) e insulina (10 U/ml) sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina ((4 U/ml)

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados de este estudio indican que las concentraciones de glucosa, triglicéridos y lípidos totales en sangre de rata se afectan cuando se induce diabetes con aloxana. Estos resultados concuerdan con reportes previos obtenidos en diversos modelos experimentales¹³⁰.

Actividad de arginasa

Algunos estudios no consideran importante el conteo plaquetario cuando se presenta diabetes⁷⁰. En nuestro estudio, las plaquetas se contaron para determinar la actividad de arginasa tanto en plaquetas de rata normal como de rata diabética y se comparó esta actividad con la de las plaquetas humanas.

No existen reportes previos que indiquen la presencia de arginasa en plaquetas. Es posible que esta enzima, cuya presencia ha sido demostrada en este estudio, sea importante para proporcionar la ornitina requerida para la síntesis de poliaminas, ya que le ha sido atribuida esta función en tejidos extrahepáticos. La ornitina es el sustrato natural de la ornitina descarboxilasa que cataliza la formación de putrescina produciéndose así el precursor de las poliaminas espermidina y espermina. Por esta razón se cree que la arginasa puede ser una de las enzimas que regula la fase inicial de la biosíntesis de poliaminas en la plaqueta, además de su función bien conocida en el ciclo de la urea¹³⁰.

Efecto de L-arginina y poliaminas

Los resultados obtenidos en la agregación plaquetaria indican que la arginina, las poliaminas y la insulina mostraron ser excelentes antagonistas cuando la agregación fue inducida por los distintos agonistas (ADP, epinefrina y trombina).

Los PRP tratados con L-arginina no mostraron agregación. El efecto antiagregante de este aminoácido se explica por la formación de óxido nítrico en el citosol plaquetario mediante la enzima óxido nítrico sintasa, dependiente de calcio y NADPH, que se activa cuando las plaquetas son estimuladas por los distintos agonistas. Estos resultados coinciden con las investigaciones realizadas por Radomski *et al*^{66,68} quienes han demostrado que el efecto antiagregante de L-arginina es a través de la formación de óxido nítrico el cual estimula a la enzima soluble guanilato ciclasa incrementando los niveles de GMPC, el cual "secuestra" al calcio, por lo que se encuentra en menor proporción para llevar a cabo la agregación plaquetaria. Es probable que la agregación plaquetaria *in vivo* sea regulada por el óxido nítrico intraplaquetario así como por el óxido nítrico y las prostaciclina de endotelio.

El efecto antiagregante de las poliaminas puede explicarse por dos mecanismos: uno, en el cual dos enzimas se ven inhibidas, la fosfolipasa C (PLC) y la proteína cinasa C (PKC), inhibiendo la formación de 1,2-DAG; el otro, específico de la espermina, es mediante la fijación de esta poliamina sobre los receptores del fibrinógeno, mecanismo similar al que realizan los amino-azúcares. En nuestro estudio, la poliamina que mostró el mejor efecto antiagregante fue la espermina tanto en plasma de rata normal como de rata diabética, aunque también la putrescina y la espermidina (espermina>espermidina>putrescina) mostraron este efecto.

Estas observaciones concuerdan con los estudios realizados por Nahas *et al*³¹ y Joseph *et al*³². Debido a que la PLC es la enzima responsable de la reacción inicial en la liberación de ácido araquidónico para la subsecuente biosíntesis de endoperóxidos de prostaglandinas, quienes son los promotores de la agregación por la liberación de ADP. Estos autores han propuesto dos mecanismos por los cuales se lleva a cabo la inhibición de agregación con poliaminas: 1) mediante la interacción iónica de los grupos amino cargados positivamente con las cabezas polares cargadas negativamente del fosfatidilinositol (PI) produciendo desplazamiento de calcio del sustrato; 2) por desplazamiento de los iones calcio de los sitios de unión de las enzimas.

En los estudios realizados por Joseph *et al*³¹ demostraron que la espermina inhibe específicamente a la trombina interfiriendo con los receptores de unión. En nuestro estudio creemos que el efecto antiagregante de las poliaminas es debido a un mecanismo de unión de estas moléculas sobre los receptores plaquetarios.

Existen investigaciones que describen que la insulina reduce el efecto agregante inducido por distintos agonistas. En nuestro estudio, la insulina no presentó gran eficiencia debido a que utilizamos una concentración más elevada. Estudios realizados por Trovati *et al*³⁴, utilizando concentraciones picomolares (pM) han demostrado la acción antagonista de la insulina.

En nuestro estudio el efecto antagonista de la insulina se presentó en los PRP estimulados con ADP y trombina aunque los porcentajes de agregación fueron mayores del 40%.

El efecto antiagregante de la insulina es a través de un incremento en los niveles de GMPc, efecto similar al que produce la L-arginina aunque creemos que el efecto sea a través de receptores, ya que la insulina potencia el efecto de los receptores, lo que puede ser sugerido al observar las ondas de agregación.

En este trabajo, inicialmente, se contempló el estudio del efecto antiagregante de L-arginina, poliaminas e insulina sobre plaquetas de rata con diabetes inducida pero esto no fue posible debido principalmente a dos razones:

- 1) La necesidad de utilizar mayor concentración de Ketalar como anestésico (0.9-1 ml.) para poder trabajar con los animales.
- 2) Se encontró que la aloxana, además de afectar el páncreas también presentó un efecto antiagregante lo que pudo comprobarse mediante la adición de solución de aloxana sobre los PRP de paciente normales produciéndose una oxidación del plasma y, por lo tanto, una inhibición de la agregación. Esto comprueba los estudios realizados por Okamoto et al 59 quienes mencionan que el efecto tóxico y oxidante de la aloxana es por la formación de radicales libres. No hay reportes que indiquen la acción antiagregante de la aloxana.

Con base a estos estudios, podemos sugerir el uso de droperidol y ketalar con el objeto de disminuir la concentración de éste último y evitar la agregación *in vivo*; del mismo modo se sugiere la utilización de otros agentes diabetogénicos como la estreptozotocina para evitar el daño al sistema circulatorio así como la agregación plaquetaria que tiende a ser mayor cuando se induce diabetes.

Es por eso que el único agonsita con el que se pudo trabajar con plaquetas de rata diabética fue trombina aunque a mayor concentración, ya que tienen la propiedad de neutralizar la acción de los anticoagulantes.

A pesar de que ya han sido realizado estudios tanto de L-arginina, poliaminas e insulina sobre la agregación plaquetaria, las técnicas utilizadas proponen métodos más laboriosos y sofisticados en donde hay una excesiva manipulación de plaquetas así como la utilización de otros reactivos. En este trabajo se utilizó una técnica sencilla en donde la máxima manipulación fue al momento de centrifugar.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La concentración de aloxana utilizada produjo serias manifestaciones clínicas entre ellas hiperglucemia e hiperlipemia encontrándose además, un efecto oxidante *in vitro* sobre PRP humano.
2. La L-arginina, las poliaminas e insulina presentaron un efecto antiagregante sobre los diferentes inductores utilizados, tanto en plasma de rata normal como de rata diabética.
3. Las concentraciones elevadas de anestésico produjeron una inhibición de la agregación plaquetaria *in vivo* por lo que se sugiere utilizar otros anestésicos para este tipo de estudios.

PERSPECTIVAS.

1. Examinar la acción farmacológica de L-arginina y recomendar el consumo de este aminoácido en la dieta con el objeto de prevenir la reactividad plaquetaria.
2. Las poliaminas tienen una excelente acción sobre el control de la hemostasia, por lo que sería interesante el diseño de medicamentos con estas moléculas cuya presencia favorecería la función plaquetaria.
3. Los resultados obtenidos sugieren algunas aplicaciones clínicas en el tratamiento de personas propensas a enfermedades tromboticas así como aquellas que padecen diabetes, donde sabemos que se afecta el metabolismo de carbohidratos y lípidos, produciéndose daños vasculares severos.

APENDICE

DETERMINACION DE GLUCOSA

Fundamento

Esta técnica se basa en la oxidación de glucosa por medio de la enzima glucosa-oxidasa con la posterior cuantificación del peróxido de hidrógeno liberado, utilizando el reactivo colorido 4-aminofenazona y fenol y, por medio de la enzima fenol-oxidasa se forma un complejo colorido cuya absorbancia se mide a 540 nm.

TRIGLICEBIDOS

Fundamento

Técnica basada en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos por la lipasa y la determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado por medio de las enzimas glicerol-cinasa, fosfoglicerol-oxidasa y peroxidasa, formándose un complejo colorido cuya absorbancia se mide a 620 nm.

LIPIDOS TOTALES

Fundamento

Técnica basada en la reacción colorimétrica que dan los lípidos del suero al reaccionar con el ácido sulfúrico formando un ión carbonilo que a su vez reacciona con un grupo carbonilo, el cual es activado por el reactivo colorido (vainillina), produciéndose un complejo de color rosa, estabilizado por resonancia, y cuya máxima absorbancia es a 540 nm.

DETERMINACION DE ARGINASA

Fundamento

Para medir el contenido de urea se utiliza una modificación del método propuesto por Geyer y Dabich.

La urea forma, en solución ácida de diacetilmonoxima y en presencia de tiosemicarbazida, un complejo colorido que se mide fotométricamente.

REACTIVOS

- A Reactivo colorido: Extracto acuoso de una solución que contiene una concentración de 1.4mM de tiosemicarbazida y 41.1mM de diacetilmonoxima.
- B Reactivo ácido: 0.1 ml de cloruro férrico 0.12M en ácido fosfórico 56.7%, esta alícuota se lleva a un volumen de 100 ml con ácido sulfúrico al 20%. Esta solución debe prepararse al momento de usarse.
- C Solución amortiguadora: Cloruro de manganeso 0.002M, Trizma®-HCl 0.004M y solución salina al 0.9%. Ajustar a pH de 7.4.
- D Solución arginina-glicina: L-arginina 0.4M y L-glicina 0.15M
- E Estándar de urea (15µg/ml): 3.8 mg de urea y aforar a 250 ml con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml del paquete plaquetario lavado con 0.4 ml de amortiguador.
2. Adicionar 0.5 ml más de amortiguador y 0.1 ml de la solución arginina-glicina.
3. Calentar a 55°C por 1 hora.
4. Introducir los tubos de reacción en agua hirviendo durante 7 minutos.
5. Tomar una alícuota de 0.2 ml del sobrenadante (centrifugar si es necesario).
6. Adicionar 0.8 ml de agua destilada, 1 ml de reactivo colorido y 2 ml de reactivo ácido.
7. Colocar la mezcla de reacción a 95°C 20 minutos.
8. Enfriar los tubos y leer la absorbencia a 530 nm.
9. Al mismo tiempo, prepara una curva estándar de urea como sigue:

TUBO	UREA µl	UREA µg	AGUA DESTILADA µl	REACTIVO COLORIDO µl	REACTIVO ACIDO µl
B	-	-	1000	1000	2000
1	100	1.5	900	1000	2000
2	200	3.0	800	1000	2000
3	300	4.5	700	1000	2000
4	400	6.0	600	1000	2000
5	500	7.5	500	1000	2000

DETERMINACION DE PROTEINAS

Fundamento

La cuantificación colorimétrica de una proteína por el uso del reactivo Folin-Ciocalteu depende de la tirosina y triptofano presentes en la proteína. El color produce por la reducción del reactivo por los residuos de tirosina observándose una relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad de color, el cual se lee a 540 nm.

REACTIVOS

- A Amortiguador: Carbonato de sodio 2%, tartrato doble de sodio y potasio 0.02% en hidróxido de sodio 0.1N.
- B Solución de sulfato de cobre pentahidratado 0.5%.
- C Mezcla cupro-alkalina (50 volúmenes de solución A en 1 volumen de solución B. Se prepara al momento de usarse.
- D Reactivo de Folin-Ciocalteu en agua (1:3).
- E Estándar de albúmina (0.2mg/ml).

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en los tubos de reacción 250µl del paquete plaquetario lavado y adicionar 200µl de hidróxido de sodio 1N.
2. Calentar a 37°C durante 30 minutos.
3. Diluir el sobrenadante 1:2.
4. Tomar una alícuota de 100µl con agua destilada.
5. Completar a 500µl con agua destilada.
6. Adicionar 2 ml de la mezcla cupro-alkalina, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
7. Adicionar 200µl del reactivo Folin-Ciocalteu, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
8. Leer la absorbencia a 540 nm.
9. Al mismo tiempo preparar una curva estándar con albúmina bovina como sigue:

TUBO	ALBUMINA µg	µl	AGUA DESTILADA µl	MEZCLA CUPRO- ALKALINA µl	REACTIVO DE FOLIN µl
B	-	-	0.5	2000	200
1	20	100	0.4	2000	200
2	40	200	0.3	2000	200
3	60	300	0.2	2000	200
4	80	400	0.1	2000	200
5	100	500	-	2000	200

AGREGACION PLAQUETARIA

ESTA INVESTIGACION
FUE REALIZADA EN EL
LABORATORIO DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Fundamento

La capacidad de la agregación plaquetaria en respuesta a diferentes agonistas se basa en los cambios de voltaje que proporciona la variación de densidad óptica o transmitancia entre un plasma rico en plaquetas (PRP) que absorbe cierta cantidad de luz y un plasma pobre en plaquetas (PPP) que permite el mayor paso de luz cuando ya ha existido la agregación.

REACTIVOS

1. ADP 2.5 μ M, concentración final.
2. Epinefrina 250 μ M, concentración final.
3. Trombina 0.4 U/ml, concentración final.
4. L-arginina 10 μ M, concentración final.
5. Putrescina 10 μ M, concentración final.
6. Espermidina 10 μ M, concentración final.
7. Espermina 10 μ M, concentración final.
8. Insulina NPH 10 U/ml concentración final.

PROCEDIMIENTO

Obtención del PRP y PPP

1. Colectar la sangre en tubos de reacción conteniendo 900 μ l de anticoagulante para rata normal y 1 ml para rata diabética.
2. Centrifugar las muestras a 2500 r.p.m. por 10 minutos para obtener el PRP.
3. Separar el suficiente PRP (4 ml como mínimo) y hacer un pool de estos plasmas.
4. Volver a centrifugar las muestras a 3000 r.p.m.

Conteo plaquetario

5. Del PRP obtenido, tomar 0.5 ml y aforar a 1 ml en una pipeta de dilución Thoma (por duplicado) y colocarlas en un agitador (Yankee® pipet shaker) por 90 segundos.
6. Descartar las primeras 6 gotas de la pipeta y colocar la siguiente gota en la cámara de Neubauer. Con la otra pipeta realizar el mismo procedimiento y colocar la gota del otro lado de la cámara.
7. Colocar la cámara de Neubauer en una cámara húmeda por 7 minutos.
8. Posteriormente, colocar la cámara en un microscopio de contraste de fases y contarlas en el objetivo 10x utilizando un contador; en el conteo sólo se tomarán los subcuadrantes I, II, III, IV y V de ambos lados de la cámara (Fig. 14).
9. El número de plaquetas obtenidas se calcula multiplicando el número obtenido por 10,000.

Agregación plaquetaria

10. Ajustar el PRP a 250,000 plaquetas tomando en cuenta el conteo plaquetario y el volumen de cada uno de los plasmas.
11. Encender el agregómetro por lo menos 30 minutos antes de las pruebas de agregación, ajustando la temperatura a 38°C y la velocidad de agitación a 1,100 r.p.m.

12. Colocar en una celdilla de vidrio 0.9 ml de PPP y calibrar el aparato a 100% de transmitancia (división 9).
13. Colocar en otra celdilla 0.9 ml de PRP (ya ajustado) y calibrar el aparato a 0% de transmitancia (división 1).
14. Adicionar el agente inductor en las celdillas con PRP y encender el registrador al mismo tiempo.
15. Para el caso de un antagonista, adicionarlo a una de las celdillas conteniendo PRP ajustado y dejarlo incubar 5 minutos, después de este tiempo adicionar el inductor y encender el registrador.

INTERPRETACION DE LAS GRAFICAS

La agregación plaquetaria aparece en una única onda de características reversibles o irreversibles, o en dos ondas sucesivas. La segunda onda siempre es irreversible dependiendo el trazado del agente inductor y de concentración.

La interpretación de las gráficas es cualitativa y cuantitativa y está en función de aquéllas proporcionadas por los controles normales.

La densidad óptica del PRP se registra automáticamente en el aparato designándole la división 1; al completarse la agregación, la densidad óptica del plasma es semejante a la del PPP, que se designa en la división 9 y, por lo tanto existen 8 divisiones efectivas (así cada vez que la aguja se desplaza en una sola división representa al 12.5% de agregación). En sentido longitudinal, el papel tiene líneas marcadas que equivalen a una pulgada de longitud y se recorren cada minuto automáticamente cronometrado por el aparato.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Brown, A.S., Martin, J.F.: The megakaryocyte platelet system and vascular disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 24(suppl.1):9-15, 1994.
- 1a. Litter, M.: Drogas hematínicas o antianémicas. Hierro y antagonistas en *Farmacología Experimental y Clínica*. 7a. edición, El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1986, pp. 1235-123.
2. Weiss, J.H.: Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *N.Engl.J.Med.* 293:531-41, 580-88, 1975.
3. Vermeylen, J., Badenhorst, P.N., Deckmyn, H., Arnout, J.: Normal mechanism of platelet function in *Chimics in Hematology*. Harker, L.A., Zimmerman, T.S. (Eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A. 12(1):107-51, 1983.
4. White, J.G.: Platelet morphology and function in *Hematology*. Williams, W., Beutler, E., Erslev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 3th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1964, pp. 1121-1133.
- 4a. White, J.G.: Platelet morphology and function in *Hematology*. Williams, W., Beutler, E., Erslev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 4th. edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1990, pp. 1172-1181.
5. Jandl, J.H.: Hemostasis in Blood, *Textbook of Hematology*. Little Brown & Co., Boston, U.S.A., 1987, pp. 965-986
6. Larson, L.: Hemostasis in *Textbook of Hematology*. McKenzie, Sh.B. (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 1988, pp. 369-398, 432-436.
7. Görg, P., Schraufstatter, I., Born, G.V.R.: Effect of removing sialic acid from endothelium on the adherence of circulating platelets in arteries *in vivo*. *Proc.RoyalSoc.London Biol.Sci.* 214:471-80, 1982.
8. Isumida, Y., Seiyama, A., Maeda, N.: Erythrocyte aggregation: binding by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochem.Biophys.Acta* 1007: 221-26, 1991.
9. Nachmias, V.J.: Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J.Cell.Biol.* 86:798-802, 1980.
10. White, J.G.: The dense bodies of human platelets. Inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood* 33: 596-603, 1969.
11. Zucker, M.B.: The functioning of blood platelets. *Sci.Am.* 42:70-89, 1960.
12. Karpatkin, S., Holmsen, H.: Composition of platelets in *Hematology*. Williams, W., Beutler, E., Erslev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 3th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1964, pp. 1136-1146.
- 12a. Holmsen, H.: Composition of platelets in *Hematology*. Williams, W., Beutler, E., Erslev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 4th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1990, pp. 1182-1200.
13. Leavell, B.S., Thorup, O.A.: Hemostasia: teoría y aplicaciones clínicas en *Hematología Clínica*. 4ta. edición, Interamericana-McGraw-Hill, 1980, pp. 514-536.

14. Faloon, C., Pfeige, G., Deckmyn, H., Vermeylen, J.: The platelet insulin receptor: detection, partial characterization and search for a function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1190-96, 1988.
15. Hynes, R.O.: The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb. Haemost.* 66:40-3, 1991.
16. Holmsen, H., Karpatkin, S.: Metabolism of platelets in Hematology. Williams, W., Beutler, E., Erselev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 3th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1984, pp. 1149-1176.
- 16a. Holmsen, H.: Metabolism of platelets in Hematology. Williams, W., Beutler, E., Erselev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 4th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1990, pp. 1200-1233.
17. Karpatkin, S., Charnatz, A., Langer, R.: Incorporation of glucose, pyruvate and citrate into platelet glycogen; glycogen synthetase and fructose-1,6-diphosphatase activity. *J. Clin. Invest.* 49:140-46, 1970.
18. Bannet, J.S., Shanttil, S.J.: Platelet function in Hematology. Williams, W., Beutler, E., Erselev, R., Lichtman, M.A. (Eds.), 4th edition, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1990, pp. 1233-1250.
19. Litter, M.: Farmacología de la coagulación sanguínea y plaquetaria. anticoagulantes y coagulantes, fibrinolíticos y antifibrinolíticos. Antiagregantes plaquetarios en Farmacología Experimental y Clínica. 7a. edición, El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1986, pp. 1260-1302.
20. Bithell, T.C.: Normal hemostasis and coagulation in Fundamental of Clinical Hematology. Thorup O.A. Jr. (Ed.), 5th edition, W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A., 1987, pp. 126-136.
21. Caen, J., Larrieu, M.J., Samama, M.: Fisiología de la hemostasia en La Hemostasia: Métodos de Exploración y Diagnóstico Práctico. Toray-Masson, Barcelona, España, 1977, pp. 3-8.
22. Miale, J.B.: Hemostasis and coagulation in Laboratory Medicine: Hematology. 6th edition, C.V. Mosby Co., St. Louis Missouri, U.S.A., 1985, 792-795.
- 22a. Salazar, G.: Fisiología plaquetaria. Avances en la reactividad plaquetaria. *Invest. Clin.* 35: 41-62, 1994.
23. Freytag, J.W., Dalrymple, P.N., Maguire, M.H.: Glomerular basement membrane. Studies on its structure and interaction with platelets. *J. Biol. Chem.* 262:9069-74, 1978.
24. Malinsky, T., Radomsky, M.W., Taha, Z., Moncada, S.: Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:960-65, 1993.
25. Vargaftig, B.B., Chignard, M., Le Couedic, J.P., Benveniste, J.: One, two, three or more pathways for platelet aggregation. *Acta Med. Scand.* 642(suppl):23-29, 1980.
26. Packham, M., Mustard, J.F.: Clinical pharmacology of platelets. *Blood* 50:555-72, 1977.

- 26a. Holmsen, A. Significance of testing platelet functions *in vitro*. *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (suppl. 1):3-8, 1994.
27. Mukherjee, M.L.: Inhibition of platelet by monoclonal antibody to glycoprotein IIb/IIIa complex in ischemic heart disease. *Thromb. Res.* 70:453-57, 1993.
28. Cook, N.S., Zerwes, H.G., Tapparelli, C.: Platelet aggregation and fibrinogen binding in human, rhesus monkey, guinea-pig, hamster, and rat blood: activation by ADP and thrombin receptor peptide and inhibition by glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Thromb. Haemost.* 70:581-89, 1993.
29. Huang, R., Soriaky, A., Church, W.R., Simons, E.R.: "Thrombin" receptor directed ligand accounts for activation by thrombin of platelets phospholipase C and accumulation of 3-phosphorylated phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 266:16535-48, 1991.
30. Nierodnik, M.L., Kojima, F., Karpatkin, S.: Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion *in vitro* and metastasis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 87: 229-36, 1991.
31. Gangarosa, E., Johnson, T.R., Ramos, H.S.: Ristocetin-induced thrombocytopenia: site mechanism of action. *Arch. Int. Med.* 106:83-9, 1960.
32. Kattlove, H.E., Gómez, H.M.: Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation. *Blood* 46:91-6, 1975.
33. Zucker, M.B., Kim, S-J., McPherson, J., Grant, R.A.: Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin. *Br. J. Haematol.* 35: 635-42, 1977.
34. Mustard, J.F., Packham, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D.W.: Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 52:453-66, 1976.
35. Kinlough-Rathbone, R.L., Packham, M.A., Reimers, H-J., Mustard, J.F.: Mechanism of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, thrombin, or A23,187. *J. Lab. Clin. Med.* 90:707-19, 1977.
36. Bick, R.L.: Acquired platelet function defects. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 6:1203-28, 1992.
37. Salzman, E.W., Chambers, D.A.: Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by substituted amino-acids. *Nature* 204:698-700, 1964.
38. Radomsky, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.: The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:1452-60, 1987.
39. Aoki, N., Naito, K., Yoshida, N.: Inhibition of platelet aggregation by protease inhibitors. Possible involvement of proteases in platelet aggregation. *Blood* 53:1-12, 1978.
40. Teng, C.M., Ko, F.N., Yu, S.M.: Inventory of exogenous factors affecting platelet aggregation isolated from plant source. *Thromb. Haemost.* 71:517-19, 1994.
41. Wang, J-P., Hsu, M.F., Teng, C.M.: Antiplatelet effect of capsaicin. *Thromb. Res.* 26:497-507, 1984.

42. Joseph,S., Kriahnamurthi,S., Kakkur,V.:Effect of the polyamine-spermine on agonist-induced human platelet activation-specific inhibition of "aggregation-independent". Events induced by thrombin, but not by collagen, thromboxane mimetic, phorbol ester or calcium ionophore. *Thromb. Haemost.* 57:191-95, 1987.
43. De La Cruz,J.P., Pavia,J., Sánchez De La Cuesta,F.: Effects of triflusal and acetylsalicylic acid on platelet aggregation in whole blood of diabetic patients. *Esr.J.Haemostol.* 40:232-36, 1988.
44. Trovati,M., Masruco,P., Mattiello,L., Mularoni,E., Anfossi,G.: Insulin increase guanosine-3',5'-cyclic monophosphate in human platelets. A mechanism involved in the insulin anti-aggregating effect. *Diabetes* 43:1015-19, 1994.
45. Berkels,R., Klaus,W., Bolls,M., Rosen,R.: The calcium modulator nifedipine exerts its antiaggregatory property via a nitric oxide mediated process. *Thromb.Haemost.* 72:309-12, 1994.
46. Batlouni,M.: Agregación plaquetaria y cardiopatía isquémica. *Farmacología Clínica de los Antiplaquetarios*, fascículo 3. Santos de México, 1995, pp. 13-19.
47. Rice,J.M., Rull,J.A.: El síndrome clínico de diabetes mellitus en Diabetes Mellitus, complicaciones crónicas. Rull,J.A., Zorrilla,E., Jachinski,M.N., Santiago,J.V. (Eds.), Interamericana-McGraw-Hill, México, 1992, pp. 3-16.
48. Brownlee,M., Cerami,A.: The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann.Rev.Biochem.* 50:385-432, 1981.
49. Skyles,J.S., Cahill,G.F.: Diabetes mellitus: progress and directions. *Am.J.Med.* 70:101-104,1981.
50. Cahill,G.F.: Current concept of diabetes in Joslin's Diabetes Mellitus. Marble,A., Krall,L.P., Bradley,R.F., Christlieb,R.A., Soeldner,J.S., (Eds.), 12th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 1985, pp. 1-11.
51. Kahn,R.E., Schecter,Y.: Insulina, agentes hipoglucemiantes orales y farmacología del páncreas endócrino en Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman,G.A., Rall,T.W., Nies,A.S., Taylor,P. (Eds.), 8va. edición, Médica Panamericana, México, 1991, pp. 1415-25.
52. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-57, 1979.
53. Report of a WHO study group on diabetes mellitus. *Geneva:World Health Organisation*, 1985.
54. Shuman,Ch.R.: Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis in Diabetes Mellitus. Gallurway,J.A., Pouduin,J.H., Schuman,Ch.R. (Eds.), 9th edition, Eli Lilly & Co., Indianapolis, U.S.A., 1988, pp. 1-13.
55. Calig,F., McDevit, J: Insulin dependent diabetes mellitus: the initial lesions. *N.Engl.J.Med.* 304:1454-56, 1981.
56. Kaibara,M., Marumoto,Y., Kobayashi,T.: Blood viscosity and erythrocyte deformability in gestational diabetes. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 22:221-24, 1984.

57. Ramos,H.G., Méndez,J.D.: Diabetes mellitus experimental en Ciencia Veterinaria. Vol.6. Moreno,R. (Ed.), UNAM, México, 1994, pp. 348-71.
58. Herr,RR., Ehle,T.E., Bergy,M.E.: The structure of streptomycin. *Antibiot.Anv.* 37:326-28, 1960.
59. Okamoto,H., Yamamoto,H.: Lessons from animal diabetes II. Schafir,E., Renold,A.E., (Eds.), J.Libbey, London, 1965, pp. 149-57.
60. Schmid-Schönbein,H., Volger,E.: Red-cells aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes* 28(suppl.2):897-902, 1976.
61. McMillan,D.E., Utterback,N.G., La Puma,J.: Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes* 27:898-901, 1978.
62. Vague,P., Juhan,I.: Red cell deformability, platelet aggregation and insulin action. *Diabetes* 32(suppl.2):86-91, 1983.
63. Pécsvarády,Z., Fisher,T., Darwin,Ch.H., Fabók,T., Maqueda,T., Saad,M.F.: Decreased polymorphonuclear leukocyte deformability in NIDDM. *Diabetes care* 17:57-63, 1994.
64. Bern,M., Boston,M.D.: Platelet functions in diabetes mellitus. *Diabetes* 27:342-50, 1978.
65. Winocour,P.D.: Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 33(suppl.2):26-31, 1992.
66. McMillan,D.E.: The effect of diabetes on blood flow properties. *Diabetes* 41(suppl.2): 56-63, 1993.
67. Méndez,J.D., Zarzoza,E., Islas,S., Guillén,C., Gutiérrez,G.: Manifestaciones y avance de las alteraciones sanguíneas y vasculares en diabetes mellitus I. Fase inicial. *Rev.Med.(IMSS)* 33:321-26, 1995.
68. Brownlee,M.: Microvascular disease and related abnormalities: their relation to control of diabetes in Joslin's Diabetes Mellitus. Marble,A., Krall,L., Bradley,R., Christlieb,R. (Eds.), 12th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 1985, pp. 186-221.
69. Murray,M.B., Bussick,E.J.: Disorders of the blood and diabetes. *ibid.* pp. 748-68.
70. Kwaan,H.C.: Changes in blood coagulation, platelet function and plasminogen-plasmin system in diabetes. *Diabetes* 41(suppl.2):32-36, 1992.
- 70a. Winocour,P.D.: Platelet turnover in advanced diabetes. *Eur.J.Clin.Invest* 24(suppl 1):34-37, 1994.
71. Mahta,P., Mahta,J.: Platelet function in diabetes mellitus in *Platelets and Prostaglandins in Cardiovascular Disease*. Mahta,J., Mahta,P. (Eds.), Future Publishing Co., New York, U.S.A., 1981, pp. 279-83.
72. Winocour,P.D., Watala,C., Kinglough-Bathbone,R.L.: Membrane fluidity is related to the extent of glycation of protein, but not to alterations in the cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects. *Thromb.Haemost.* 67:567-71, 1992.

73. Nordøy, A., Rødsæt, J.M.: Platelet phospholipids and their function in patients with juvenile diabetes and maturity onset diabetes. *Diabetes* 19:696-702, 1970.
74. Song-yuan, Ch., Hin-jie, Y., Yi-quea, L., Wen-dong, L.: Platelet aggregation, platelet cAMP levels and thromboxane B₂ synthesis in patients with diabetes mellitus. *Chin.Med.J.* 103:312-18, 1990.
75. Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K., Levine, J., Sagal, J.: Altered platelet function in diabetes mellitus. *Diabetes* 25(suppl.2):826-31, 1976.
76. Muruganandam, A., Romsa, G.J., Thibert, R.J., Mutus, E.: Glycosylated calmodulin from platelets as an index of glycoemia control. *Chin.Chem.* 33:215-19, 1993.
77. Winocour, P.D., Kinlough-Rathbone, R.L., Mustard, J.F.: Platelet survival in rats with spontaneous diabetes mellitus. *J.Lab.Clin.Med.* 109:464-8, 1967.
78. Winocour, P.D., Kinlough-Rathbone, R.L., Mustard, J.F.: Pathways responsible for platelet hypersensitivity in rats with diabetes I & II. Streptozotocin-induced diabetes. *J.Lab.Clin.Med.* 107:143-58, 1966.
79. Jones, R.L., Peterson, Ch.M.: Hematology alterations in diabetes mellitus. *Am.J.Med.* 70:339-52, 1981.
80. Burri, A.J., Dougherty, R.M., Kelly, D.S., Iacomo, J.M.: Platelet aggregation in humans is affected by replacement of dietary linoleic acid with oleic acid. *Am.J.Clin.Nutr.* 54:356-62, 1991.
81. McVeigh, G.E., Brennan, G.M., Johnson, G.D., McDermott, B.J., McGrath, L.T., Henry, W.R., Andrew, J.W., Hayes, J.R.: Dietary fish oil augments nitric oxide production or release in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:33-8, 1993.
82. Sánchez De La Cuesta, F.: Trifusil, antiagregante plaquetario. *Drugs of Today* 31:3-34, 1995.
83. Kwaan, H.C., Colwell, J.A., Suwanwala, N.: Disseminated intravascular coagulation in diabetes mellitus with reference to the role of increased platelet aggregation. *Diabetes* 21:106-13, 1972.
84. Litter, M.: Farmacología del metabolismo de los carbohidratos y lípidos. Insulina, hipoglucemiantes orales, hiperglucemiantes. Agentes hipolipidémicos en Farmacología Experimental y Clínica. 7a. edición, El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1986, pp. 936-68.
85. Orci, L., Vasalli, P.: La fábrica de insulina. *Investigación y Ciencia* Nov.:146-48, 1988.
86. Lienhard, G.E., Slot, J.W., James, D.E.: How cells absorb glucose. *Sci.Am.* 268:34-9, 1992.
87. Kahn, R., Schechter, Y.: Insulina, agentes hipoglucemiantes orales y farmacología del páncreas endócrino en Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman, A., Rull, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (Eds.), 6a. edición, Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1990, pp. 1415-45.
88. Amatruda, J.M., Livingstons, J.W., Lockwood, D.H.: Insulin receptor: role in the resistance of human obesity to insulin. *Science* 185:264-66, 1976.

89. Olefsky, J.M., Reaven, G.M.: Insulin binding in diabetes. Relationships with plasma insulin levels and insulin sensitivity. *Diabetes* 26:680-88, 1977.
90. Schmidt, H.H.H., Warner, J.D., Ishi, K., Sheng, H., Murad, F.: Insulin secretion from pancreatic β -cell caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 255:721-23, 1992.
91. Voet, D., Voet, J.G.: Aminoacid metabolism in Biochemistry. 2nd edition, John Wiley & Sons., New York, U.S.A., 1995, pp. 678-729.
92. Seifer, E., Rettura, G., Barbul, A.: Arginine: an essential aminoacid for injured rats. *Surgery* 84:224-30, 1978.
93. Bromms, H.J., Hahn, H.J., Lucke, S., Hildebrandt, W.: Arginine stimulated insulin and glucagon release from islets transplanted into the liver of diabetic rats. *Horm.Metab.Res.* 21:587-89, 1989.
94. Taminaga, Y., Komya, L., Johnson, H.J.: Loss of insulin response to glucose but not arginine during development of autoimmune diabetes in BB/rats: relationships isolated volume and glucose transport rate. *Proc.Natl.Acad.Sci,USA* 87: 4190-96, 1990.
95. Kishino, Y., Kawamura, S.: Pancreatic damage induced by large dose of arginine. *Vitkeme Archiw (Cell Pathology)* 47:147-55, 1989.
96. Méndez, J.D., Arreola, M.A.: Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamine in alloxan treated rats. *Biochem.Internat.* 23:569-75, 1992.
97. Pronai, L., Ishimori, K., Nosaki, H., Nakazawa, H., Okino, H.: Investigation of the existence and biological role of the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets by spin trapping/EPR studies. *Eur.J.Biochem.* 202:923-30, 1991.
98. Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulate aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci,USA* 87:5193-97, 1990.
99. Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.: Characterization of the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets. *Br.J.Pharmacol.* 101:325-28, 1990.
100. Ignarro, L.J.: Physiological significance of endogenous nitric oxide. *Sem.Perinatol.* 15:20-6, 1991.
101. Faint, R.W., Mackie, J.I., Machin, S.J.: Platelet aggregation is inhibited by nitric oxide-like factor released from human neutrophils *in vitro*. *Brit.J.Haematol.* 77:539-45, 1991.
102. Snyder, S.H., Bred, D.S.: Biological roles of nitric oxide. *Sci.Am.* 266:68-71, 1992.
103. Masini, E., Mannaioni, P.F., Pistelli, A., Salvemini, D., Vane, J.: Impairment of the L-arginine-nitric oxide pathway in mast cell from spontaneously hipertensive rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 177:1178-82, 1991.
104. Moncada, S., Palmer, R.M.J.: Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Sem.Perinatol.* 15:16-19, 1991.
105. DeGraaf, J.C., Banga, J.D., Moncada, S., Palmer, R.M.J.: Nitric oxide function as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 88:2284-90, 1992.

106. Moncada, S., Higgs, A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* **329**: 2002-11, 1993.
107. Palmer, R.M.J., Moncada, S.: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cell. *Biochem.Biophys.Res.Communs.* **158**:345-52, 1989.
- 107a. Metha, J.L., Chen, L.Y., Kone, B.C., Metha, P., Turner, P.: Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J.Lab.Clin.Invest.* **125**:370-77, 1995.
- 107b. Dettler, M., Border, W.A., Noble, N.A.: Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am.J.Physiol.* **267**:F197-F-207, 1994.
108. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium relaxing factor. *Nature* **327**:524-56, 1987.
109. Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**:664-66, 1988.
- 109a. Vasta, V., Meacci, E., Farnararo, M., Bruni, P.: Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Communs.* **206**:578-84, 1995.
110. Rodríguez, R.E., Nufes, J.C.: La enzima arginasa: bioquímica general, metabolismo e interés de la determinación sérica en patología hepática. *Rev.Clin.Esp.* **123**:213-19, 1971.
111. Méndez, J.D., Martínez, I.: Arginase activity in ram epididymal ejaculated spermatozoa. *ABTA* **7**:131-36, 1995.
112. Tabor, C.W., Tabor, H.: 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann.Rev.Biochem.* **45**:285-306, 1976.
113. Méndez, J.D.: Poliaminas en Bioquímica e Inmunología. Hicks, J.J., Díaz Zagoya, J.C. (Eds.). Vol.II, Facultad de Medicina, UNAM, México, 1986, pp. 365-85.
114. Parascu, L., Heby, O.: Molecular genetics of polyamines synthesis in eukaryotic cells. Elsevier Science Publishers, April 15:153-58, 1990.
115. Niskanen, E., Kallio, A., McCann, D.G. The role of polyamine biosynthesis in hematopoietic precursor cell proliferation in mice. *Blood* **61**:740-45, 1983.
116. Pegg, A.E., McCann, P.P.: Polyamine metabolism and function. *Am.J.Physiol.* **243**:c212-21, 1982.
117. Pegg, A.E.: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem.J.* **234**:249-62, 1986.
118. Hougard, D.M., Nielsen, J.H., Larsson, L-L: Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem.J.* **238**:43-47, 1986.
119. De Mais, L., Suzano, V.A.: Uncoupling of muscle and blood platelets Ca²⁺ transport ATPases by heparin. *J.Biol.Chem.* **269**:14525-29, 1994.

120. Luk,D.G., L., Sharkis,S.J., Abeloff,M.D., McCann,P.P., Sjoerdama,A., Baylin,S.B.: Polyamine biosynthesis is required for the maintenance of peripheral blood cell elements in the rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:5090-93, 1983.
121. Nahas,N., Graaf,G.: Inhibitory activity of polyamines on phospholipase C from human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Communs.* 109:1036-40, 1982.
- 121a.Rehse,K., Puchert,E., Leifring,S.: Alkyl- und Arylalkylderivate von putrescín, spermidin und spermin. *Arch.Pharm.(Weinheim)* 323:287-94, 1990.
- 121b.Kesselhut,A., Ebel,H., Bruchhausen,F., Rehse,K.: Interactions of the oligoamine RE 1492 with biomembranes. *Arch.Pharm.(Weinheim)* 323:21-7, 1990.
122. Born,G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-29, 1962.
123. Trinder,P.: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann.Clin.Biochem.* 6:24-7, 1969.
124. Frings,C.S., Fendley,T.W., Dunn,R.T., Queen,C.A. Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clin.Chem.* 18:673-77, 1972.
125. Knigh,J.A., Anderson,S., Rawle,J.M. Chemical basis of the sulpho-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin.Chem.* 18:199-203, 1972.
126. Wahlefeld,A.W. *Bergmeyer Methoden der enzymatischen analyse.* Band II, 3er auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1974, pp. 1898.
127. Lowry,D.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-75, 1951.
128. Kung,J.J., Brooks,S.B., Jakmay,J.P., Leonard,L.L., Talmage,D.W.: Suppression of *in vitro* cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J.Exptl.Med.* 146:665-71, 1977.
129. Méndez,J.D., Ramos,H.G.: Animal models in diabetes research. *Arch.Med.Res.* 25:367-75, 1994.
130. Méndez,J.D.: Polyamines and human reproduction in *The physiology of polyamines.* Bachrach,M., Heimer,Y. (Eds.), CRC Press Inc., Florida, U.S.A., 1969, pp. 23-26.
131. Agam,G., Gartner,T.K., Livne,A.: Inhibition of platelet agregation an endogenous lectin activity by oligoamines. *Thromb.Res.* 33:245-57, 1984.