



**INSTITUTO  
BOLIVIANO DE  
BIOLOGIA  
DE LA ALTURA**

**ANUARIO  
1983 - 1984**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
MINISTERIO DE PREVISION SOCIAL Y  
SALUD PUBLICA  
COOPERACION TECNICA DE FRANCIA

EN HOMENAJE AL SESQUICENTENARIO DE LA FACULTAD DE MEDICINA UMSA

# Extracción y purificación de la fibronectina plasmática, su efecto en la agregación de las plaquetas sanguíneas humanas por diferentes inductores.

Aida Quintela

Dpto. Hematología I.B.B.A.

INSERM – Unité 150 (Prof. J. Caen) París - Francia

## SUMMARY

*Fibronectin was purified from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. The method was based on the previously known binding of fibronectin to gelatin. The novel features of this method are the use of aginine in the elution of fibronectin from immobilized gelatin (6) and the use of arginine-sepharose as second affinity step. The purified protein was homogeneous as verified by polyacrylamide-gel electrophoresis. The yield was 60 o/o.*

*The purpose of this study was to determine the influence of the fibronectin on the aggregation of the platelets in patients who present hypoaggregability of the platelets to ADP, arachidonic acid and collagene. The concentration of fibronectin in human plasma is about 300 mg/liter.*

## RESUME

*La fibronectine a été purifiée du plasma humain dans des conditions non-denaturantes, par chromatographie d'affinité. La methode est basée sur l'affinité de la fibronectine pour le collagene dénaturé ou gélatine. Les nouvelles caracteristiques de cette methode sont l'usage de l'arginine dans l'élution de la fibronectine du collagene immobilisé (6) et l'usage de l'arginine-sepharose comme deuxième étape d'affinité. La pureté de la fibronectine est vérifiée par électrophorese analytique sur gel de polyacrilamide.*

*Le propos de ce travail a été l'étude de l'incidence de la fibronectine sur les agregations plaquettaires des sujets qui presentent hipoagregabilité plaquettaire a l'ADP, a l'acide arachidonique et au collagene. La concentration de fibronectine dans le plasma humain est 300 mg/litre.*

## RESUMEN

La fibronectina fué purificada del plasma humano en condiciones no desnaturalizantes, por cromatografía de afinidad. El método está basado en conocimiento previo de la adhesión de la fibronectina a la gelatina. Las

nuevas características de este método son: el uso de la arginina en la elución de la fibronectina de la gelatina inmovilizada (6) y el uso de la arginina-sefarosa como segundo paso de afinidad. La proteína purificada se justifica con la electroforesis en gel de poliacrilamida. La producción fué del 60 o/o.

El propósito de este trabajo, ha sido el estudio de la influencia de la fibronectina sobre las agregaciones plaquetarias, en sujetos que presentan hipoagregabilidad plaquetaria al ADP, al ácido araquidónico y al colágeno. La concentración de la fibronectina en el plasma humano es de 300 mg/litro.

**PALABRAS CLAVE.**- Fibronectina, colágeno o gelatina, cromatografía, agregación plaquetaria.

## INTRODUCCION

Es sabido que los habitantes de las grandes alturas se caracterizan por una incidencia particularmente moderada de accidentes trombóticos tanto arteriales como venosos. Entre los factores que pueden explicar este fenómeno, ha sido puesto en evidencia la existencia de un factor plasmático, responsable de la hipoagregabilidad de las plaquetas (10) de estos sujetos; pues estas plaquetas, aisladas y resuspendidas en un tampón conteniendo fibrinógeno, calcio y gammaglobulinas mostraban un período de agregabilidad comparable a la de los sujetos que viven a nivel del mar.

En 1974, Kleb (1) descubrió una proteína sérica necesaria para la fijación de las células BALB 3T3 transformadas por virus SV40 a superficies recubiertas de colágeno y que en ausencia de suero, esta fijación no se producía. Esta observación llevó a la separación de una glicoproteína de peso molecular 440.000 daltones, presentándose bajo la forma de un dímero compuesto de dos subunidades de peso molecular 220.000 cada una, asociadas por puentes disulfuro. Esta glicoproteína ha sido identificada bajo el nombre de FIBRONECTINA (2), identificada en la superficie de numerosas células, entre ellas los fibroblastos (3), las células epiteliales (4) y las endoteliales (5) estas últimas las sintetizan y las secretan a la matriz extracelular.

Se ha hecho este estudio con el fin de observar si existe una posible deficiencia de fibronectina en los sujetos que presentan hipoagregabilidad plaquetaria a los diferentes inductores y de esta manera relacionar ambas.

Para ello se han estudiado en una primera etapa, sujetos que viven a nivel del mar. Nuestro interés radica en complementar el estudio en sujetos de la altura.

Este trabajo comprende dos partes:

- 1.— Purificación de la fibronectina plasmática y su dosage en el plasma.
- 2.— Estudio de la agregación plaquetaria con diferentes inductores en presencia de plasma desprovisto de fibronectina.

## METODOS

El trabajo se realizó en 13 sujetos normales, en su mayoría donadores de sangre.

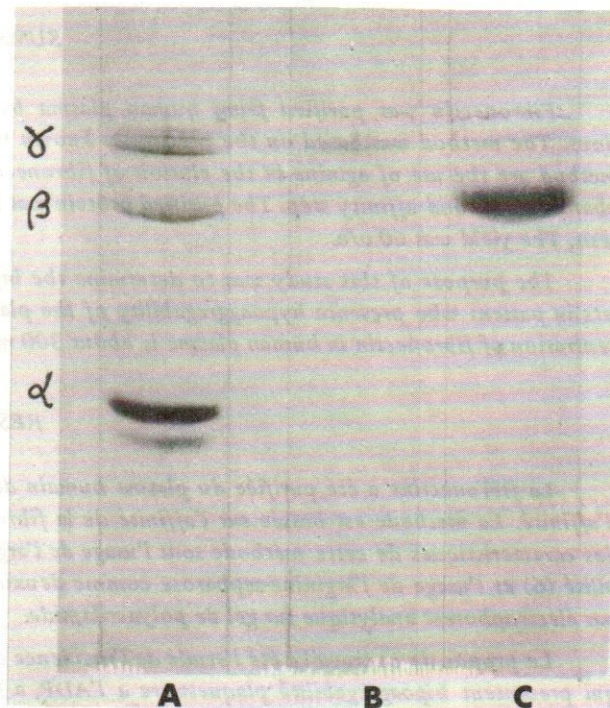
**Purificación.**- La fibronectina ha sido purificada por cromatografía de afinidad (6), siguiendo las siguientes etapas.:

- 1<sup>o</sup>- Cromatografía del plasma sobre una columna de sefarosa 4B (S4B)
- 2<sup>o</sup>- Cromatografía de afinidad sobre gelatina/sefarosa.
- 3<sup>o</sup>- Cromatografía sobre arginina/sefarosa.

Todas las operaciones han sido hechas a 22°C, con excepción de la diálisis a 4°C.

El plasma pobre en plaquetas (PPP) fué obtenido a partir de 50 ml de sangre tomada sobre 5 ml de citrato trisódico al 3.8 o/o.

Figura 1



### ELECTROFORESIS SOBRE GEL DE POLYACRYLAMIDA EN PRESENCIA DE S.D.S.

A: Colágeno de tipo I sirviendo de testigo de migración

Trimeros  $\gamma$  : P.M. 300.000

Dímeros  $\beta$  : P.M. 200.000

Cadenas  $\alpha$  : P.M. 100.000

B: Fibronectina

C: Fibronectina + Beta - Mercaptoetanol.

La sangre fué centrifugada a 1000 rpm 15' a temperatura de 15°C; se separó el sobrenadante plasmático rico en plaquetas (PRP) con el que se realizaron todas las pruebas de cromatografía para obtener la fibronectina.

La pureza de la fibronectina fué verificada por electroforesis analítica. La electroforesis sobre gel de poli-acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), suministra un excelente método para la caracterización de las proteínas (7). El peso molecular de una proteína es determinado por comparación de su movilidad electroforética con la de las proteínas testigo de peso molecular conocido.

El plasma obtenido después del paso sobre la columna de sefarosa/gelatina, es desprovisto de fibronectina. Luego fué utilizado para los estudios de agregación plaquetaria.

## RESULTADOS

Se puede ver en la Figura 1, que la fibronectina no presenta más que una sola banda. Después de reduc-

ción por el beta-mercaptoetanol, se obtuvo una banda de peso molecular aproximadamente de 200.000 daltones.

Por esta técnica se recuperó 0.49 mg. de fibronectina por ml de plasma de partida (promedio de 13 purificaciones). Esto es muy próximo de los resultados de Vuento y Vaheiri, ya que ellos obtienen 0.45 mg de fibronectina por ml de plasma de partida.

**Dosage de la fibronectina en el plasma.-** Segunda técnica de Laurell (8).

El dosage se efectuó por inmuno-electroforesis. Esto nos ha permitido dosificar directamente después de la concentración, la fibronectina eluida de la columna de sefarosa/gelatina.

**Estudio de la agregación plaquetaria en plasma desprovisto de fibronectina.-**

La agregación estudia la respuesta de las plaquetas a diferentes agentes agregantes, midiendo las variaciones

CUADRO I

MEDIO DE RESUSPENSION DE PLAQUETAS	INDUCTOR	VOLUMEN AÑADIDO	VELOCIDAD DE AGREGACION PLAQUETARIA
PPP citratado	ADP 10 <sup>-6</sup> M	40 ul	15 o/o
	ADP 10 <sup>-5</sup> M	5 ul	22 o/o
	Acido araquidónico (20 mg/ml)	4 ul	29 o/o
	Colágeno (500 mg/ml)	50 ul	—
	Colágeno	100 ul	40 o/o
PPP Sefarosa 4B	ADP 10 <sup>-6</sup> M	40 ul	—
	ADP 10 <sup>-5</sup> M	5 ul	16 o/o
	Acido araquidónico	8 ul	16,5 o/o
	Colágeno (500 mg/ml)	100 ul	17 o/o
PPP desprovisto de fibronectina	ADP 10 <sup>-6</sup> M	40 ul	0.3 o/o
	ADP 10 <sup>-5</sup> M	5 ul	0.3 o/o
	Acido araquidónico	8 ul	0.45 o/o
	Colágeno	100 ul	0
PPP desprovisto de fibronectina + 80 ug fibronectina (100 ul/ 0.3 ml de PPP)	ADP 10 <sup>-6</sup> M	50 ul	23 o/o
	ADP 10 <sup>-5</sup> M	10 ul	33 o/o
	Acido araquidónico	8 ul	38.5 o/o
	Colágeno	100 ul	22.5 o/o

Porcentaje de las agregaciones plaquetarias.

de turbidez del medio en el cuál las plaquetas están en suspensión (plasma o tampón).

## METODO

La sangre es tomada sobre anticoagulante ACD pH4, 5 (1 vol/6 - vol de sangre). Este anticoagulante es usado solamente para aislar y lavar las plaquetas, puesto que en las otras determinaciones se usó citrato trisódico al 3,8 o/o.

La prueba de la agregación plaquetaria fué realizada por el método turbidimétrico de BORN (9) a 37°C bajo agitación continua.

### Medida de la agregación.-

Agregaciones inducidas por el ADP, ácido araquidónico y colágeno. La agregación comienza al añadir en las suspensiones de las plaquetas, el ADP ( $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M) (5ul, 10ul, 20ul); el ácido araquidónico (4ul, 8ul) y el colágeno de tipo III (50 ul y 100 ul).

La agregación se traduce por un aumento de la transmisión óptica del haz luminoso a través de la cubeta, aumento registrado sobre un registrador acoplado al agregómetro.

## RESULTADOS

El Cuadro I muestra que las plaquetas resuspendidas en plasma desprovisto de fibronectina; no reaccio-

nan con los diferentes inductores de la agregación. En cambio cuando la fibronectina aislada es añadida a este plasma, se recupera la actividad inicial en un 46 o/o que se traduce en la velocidad de la agregación plaquetaria.

De esta manera corroboramos anteriores observaciones en sentido de que, la fibronectina purificada es necesaria para la agregación plaquetaria.

## DISCUSION

Según nuestros estudios, la fibronectina desempeña un rol en la agregación plaquetaria, por cuanto las plaquetas sanguíneas normales resuspendidas en plasma desprovisto de fibronectina, pierden su agregabilidad a los principales agentes agregantes (ADP, AA, colágeno) pero la recuperan luego de la adición de fibronectina purificada a estos plasmas.

Se puede entonces considerar que los plasmas de los sujetos que viven en la altura y que presentan una hipogregabilidad plaquetaria, pueden presentar una tasa de fibronectina disminuída. Estudio que verificaremos próximamente, purificando y determinando por inmunoelectroforesis la fibronectina plasmática de estos sujetos y verificando si se obtiene una agregabilidad normal de sus plaquetas, después de la adición a su plasma de fibronectina humana purificada.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Drs.: J.P. Caen, Y. Legrand, F. Fauvel, C. Soria, quienes colaboraron en la realización de mi trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- KLEB R.J. Isolation of collagen dependent cell attachment factor Nature (London) 250: 240, 1974.
- 2.- ROUSLAHTI E., VAHERI A. Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. J. Exp. Med. 141: 497, 1975.
- 3.- ROUSLAHTI E., VAHERI A., KUUSELA P., LINDER E. Fibroblast surface antigen: a new serum protein Biochem. Biophys. Acta 322: 352, 1973.
- 4.- CHEN L.B., MAITLAND N., GALLIMORE P.M., McDUGALL J.K. Detection of the large external transformation sensitive protein on some epithelial cells. Exp. Cell. Resp. 106: 39, 1977.
- 5.- BORNSTEIN P., DUKSIN D., BALIAN G., DAVIDSON J.M., CROUCH E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface to cell-matrix interactions in vitro and in vivo. Ann. N.Y. Acad. Sc. 312: 93, 1978.
- 6.- VUENTO M., VAHERI A. Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. Biochem. J. 183: 331, 1979.
- 7.- FURTHMAYR H., TIMPL R. Characterization of collagen peptides by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis. Anal. Biochem. 41: 510, 1971.
- 8.- LAURELL C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies Anal. Biochem. 15: 45, 1966.
- 9.- BORN G.V.R., CROSS M.J. The aggregations of blood platelets. J. Physiol. (Lond) 168: 78, 1963.
- 10.- CAEN J.P., DROUET L., RODRIGUEZ A., MICHEL H., BEDROUX R. Etude des fonctions plaquettaires et de coagulation chez les amerindiens vivant en haute altitude. Anthropologie des populations andines. INSERM. Vol. 63: 455, 1976.