

# Metabolismo fosfolipídico en plaquetas

Diva Bellido

Dpto. de Bioquímica - IBBA

## SUMMARY

*The hypoaggregativity of the platelets in presence of certain aggregatory inductors, the relative decrease of magnesium, hypolipidemia, hypoglycemia, and the reduced predisposition for arterial thrombosis in aymaras and quechuas living at high altitude, seem, to be related with the phospholipidic metabolism.*

*Since platelets are considered to be the most important atherogenic and thrombogenic agents, comparative studies were carried out in three populations of both sexes concerning the phospholipidic composition of the platelets and "in vitro" analysis with respect to the exchange of polar phospholipidic biomolecules of platelets with their homologous bases of the circum ambiente of these cells.*

*It was shown that the main phospholipids (phosphatidylcholine phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine phosphatidylinositol) exist in similar quantities in the aymaras, quechuas and european populations. However, lysophosphatidylcholine was found in higher concentrations and sphingomyelin in smaller concentrations in aymaras and quechuas compared with the european populations.*

*The labeled molecules choline, serine and ethanolamine exchange with their homologous bases of the phospholipids in similar proportions in the three populations whom we studied, phosphatidylcholine exchanges its base with its homologous molecule of the circum ambiente in a higher percentage than phosphatidylethanolamine and the latter in a higher percentage than phosphatidylserine.*

*The presence of calcium and magnesium ions in the medium of incubation of the platelets favor the exchange of polar phospholipidic molecules enormously, this renewal being increased more by calcium than by magnesium, ethylenediaminetetraacetic acid, glucose and kalium cyanid inhibit this reaction partially.*

## RESUMEN

La hipoagregabilidad plaquetaria en presencia de ciertos inductores de la agregación, la relativa disminución de magnesio, hipolipidemia, hipoglicemia y la disminuída predisposición a las trombosis arteriales de aymaras y quechuas, habitantes de grandes alturas, parecen estar relacionados con el metabolismo fosfolipídico.

Como las plaquetas sanguíneas son consideradas los más importantes agentes aterógenos y trombógenos,

realizamos en 3 poblaciones de ambos sexos estudios comparativos relacionados con la composición fosfolipídica de plaquetas y análisis "in vitro" relacionados al intercambio de biomoléculas polares fosfolipídicas de plaquetas con sus homólogos del medio circundante a estas células.

En efecto, evidenciamos que los principales fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol) se encuentran en cantidades similares en las poblaciones aymaras, quechuas y euro-

peas. Sin embargo, la lisofosfatidilcolina está en concentraciones mayores y la esfingomielina en concentraciones menores en aymaras y quechuas en relación a las poblaciones europeas.

Las moléculas marcadas colina, serina y etanolamina intercambian con sus homólogas de los fosfolípidos en proporciones semejantes en las tres poblaciones estudiadas, la fosfatidilcolina intercambia su base con la homóloga del medio externo en mayor porcentaje que la fosfatidiletanolamina y esta última en mayor porcentaje que la fosfatidilserina.

La presencia de iones calcio, magnesio, en el medio de incubación de las plaquetas, favorece enormemente el intercambio de moléculas polares fosfolípídicas, incrementándose más esta renovación con el calcio que con el magnesio; el ácido etilendiaminotetraacético, glucosa y cianuro de potasio inhiben parcialmente esta reacción.

## INTRODUCCION

Las concentraciones incrementadas de ciertas lipoproteínas están asociadas a la trombosis y esta asociación está estrechamente relacionada con la arterioesclerosis (8). Así Robert y col. (10) demostraron que la concentración elevada de  $\beta$  lipoproteínas contribuye a la agregación plaquetaria; en efecto, pacientes con hiperlipidemias de tipo II tienen una particular predisposición a la trombosis, evento clínico dos veces mayor en relación al tipo IV, precisamente porque en este tipo de hiperlipidemias existe una incrementada función de plaquetas la que se manifiesta por la mayor sensibilidad a los inductores de la agregación plaquetaria (ADP, epinefrina y colágeno) y por la mayor formación de tromboxano A<sub>2</sub> (agregante plaquetario).

En todas las hiperlipidemias (excepto en el tipo I) los fosfolípidos plasmáticos se encuentran en concentraciones incrementadas (5), de igual manera se evidenció que el contenido de fosfolípidos en plaquetas de pacientes con tipo II es mucho más alto que el de los normales (10), al respecto se sabe que los fosfolípidos plaquetarios forman parte del sistema catalítico de la coagulación sanguínea endógena y se sugiere que la actividad de este sistema estaría determinada por la calidad, cantidad y liberación de fosfolípidos plaquetarios.

El estudio de fosfolípidos es muy importante no solo porque estas moléculas poseen fuertes actividades **precoagulantes** sino porque llevan en su seno moléculas que son materia prima para la síntesis de interesantes especies químicas (tromboxanos, prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos), algunas de ellas con propiedades

miotropas (cambios que inducirían la formación de trombos), otras agregantes plaquetarias y otras antiagregantes, estas dos últimas regularían los procesos trombóticos en el organismo humano (9).

Las plaquetas de quechuas y aymaras, habitantes de grandes alturas, parecen tener una respuesta metabólica peculiar a ciertos nucleótidos (3), en efecto estas células son hipoagregantes a una determinada concentración de ADP, concentración en la cual las plaquetas de otras poblaciones se agregan rápidamente. Estas poblaciones no solo se caracterizan por la singular biodinámica de sus plaquetas, sino por poseer concentraciones bajas de colesterol, fosfolípidos (1), ácidos grasos, (2) glucosa (6) y magnesio sérico (7), valores muy relacionados con la poca sensibilidad que manifiestan las mencionadas poblaciones a las trombosis arteriales (3).

## MATERIAL Y METODOS

**Obtención del material biológico.**- Se obtuvo sangre total de sujetos sanos (15 aymaras, edad promedio  $20 \pm 3$ ; 15 quechuas, edad promedio  $21 \pm 4$  y 12 franceses de edad promedio  $27 \pm 6$  años. Todos habitantes de la ciudad de La Paz (3.600 m. sobre el nivel del mar).

La composición fosfolípídica se determinó en todos los individuos de las 3 poblaciones, la incorporación de bases radioactivas y la influencia en esta incorporación por otras moléculas fue efectuada en 5 sujetos de cada grupo.

**Separación de plaquetas.**- A 10 ml de A.C.D. (ácido cítrico, citrato trisódico y dextrosa) preparados según el método de Aster y Jandl, se añadió 40 ml de sangre total, los que fueron centrifugados a bajas revoluciones (950 r.p.m. en una centrífuga Jouan E-95) durante 15' a 15°C; el plasma rico en plaquetas fue recentrifugado a 2.600 r.p.m. 15' a 15°C, al precipitado de plaquetas se añadió una alícuota de tampón fisiológico constituido de NaCl 8 g; KCl 0.2g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 g; NaHCO<sub>3</sub> 1 g; albúmina 11.6 mg y agua cantidad suficiente para un litro; pH: 7.35, en esta suspensión se hizo el recuento de plaquetas para posteriormente añadir más tampón y obtener 15 mg de plaquetas en 0.5 ml de tampón.

**Incorporación de bases radioactivas en fosfolípidos plaquetarios.**- Tubos conteniendo 15 mg de plaquetas frescas y enteras suspendidas en 0.5 ml de tampón fisiológico fueron llevados a baño maría de 37°C. durante 19' para posteriormente añadir el material radioactivo correspondiente, 50  $\mu$ l de (metil C<sub>14</sub>, cloruro de colina de actividad específica 0.52  $\mu$ Ci/0.01  $\mu$ M; 40  $\mu$ l de (2-C<sub>14</sub>) etan 1 o 2 cloruro de amina, de actividad específica 0.2

u Ci/0.01 uM y 50 uI de DL (3-C<sup>14</sup>) serina de actividad específica 0.5 uCi/0.01 uM.

Para determinar la acción del calcio, magnesio, cianuro de potasio, glucosa y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se prepararon soluciones de los mismos en tampón fisiológico y se añadieron por separado a cada tubo que contenía 15 mg de plaquetas en 0.5 ml de tampón fisiológico, 10 uI de CaCl<sub>2</sub> 0.125 M; 10 uI de MgCl<sub>2</sub> 0.125 M; 20 uI de KCN 0.025 M; 20 uI de glucosa 0.128 M; 20 uI de EDTA 0.02 M; con una concentración final en 0.5 ml de 1.25 uM para el CaCl<sub>2</sub> y el MgCl<sub>2</sub>; 2.5 uM, 0.5 uM y 0.4 uM para la glucosa, KCN y EDTA respectivamente. La incubación a 37°C fué durante dos horas.

El porcentaje de radioactividad incorporada se efectuó tomando en cuenta la radioactividad incorporada en el fosfolípido sobre la cantidad total de radioactividad añadida al medio de incubación (15 mg de plaquetas en 0.5 ml) multiplicado por 100.

La radioactividad fue detectada en un aparato Beckman modelo LS 8000 liquid scintillation system.

Los resultados de aymaras y quechuas fueron similares razón por la cual se consideran en nuestros cuadros como si fuese una sola población.

**Extracción de Bligh y Dyer.**- Consiste en añadir a una suspensión plaquetaria (15 mg de plaquetas en 0.5 ml de tampón) 2 ml de cloroformo-metanol-agua en proporciones de 4-5-2 respectivamente, agitar, separar la parte clorofórmica para luego evaporar. Añadir 1 ml de cloroformo al extracto seco y efectuar la evaluación de los diferentes lípidos y las fracciones fosfolípídicas.

**Cromatografía en capa fina.**- Se utilizaron placas de silicagel H (Merck), una vez efectuado el depósito, se so-

metieron a la migración en doble dimensión usando los solventes, acetona éter en la proporción de 1-3 y el sistema de Skipski; cloroformo-metanol-ácido acético y agua en las proporciones de 75-45-12-6 respectivamente.

El fósforo total de las plaquetas y de sus diferentes fracciones se evaluó según el método de Chen y Col. (4).

En el cuadro I apreciamos que la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, se encuentran en valores casi semejantes en las poblaciones estudiadas. Por el contrario, parece que la lisofosfatidilcolina se encuentra en mayores concentraciones y la esfingomielina en menores cantidades en los quechuas - aymaras, en relación a la población francesa.

Los valores de fosfolípidos en 15 aymaras y 15 quechuas fueron semejantes, por lo cual consideramos las dos poblaciones como una sola.

**CUADRO II**  
**INCORPORACION DE BASES MARCADAS EN LOS DIFERENTES FOSFOLIPIDOS EN FUNCION DEL TIEMPO**

MOLECULAS RADIOACTIVAS	Tiempo de incubación (37°C) de plaquetas			
	30'	60'	120'	180'
Colina	0.8 o/o	2.1 o/o	8.2 o/o	7.5 o/o
Etanolamina	3.9 o/o	5.6 o/o	7.9 o/o	7.1 o/o
Serina	2.7 o/o	4.5 o/o	5.9 o/o	5.4 o/o

La mayor cantidad de moléculas radioactivas se incorpora a los 120' (Cuadro II) donde la colina intercambia con la base del fosfolípido plaquetario en mayor cantidad que la etanolamina y esta última en mayor cantidad que la serina. Los valores de este cuadro se obtuvieron en 5 aymaras y 5 quechuas.

**CUADRO I**  
**PORCENTAJE DE FOSFOLIPIDOS DE PLAQUETAS HUMANAS**

FOSFOLIPIDOS	Población Aymara-quechua		Población Francesa	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Lisofosfatidilcolina	1.8 o/o	3.8 o/o	0.1 o/o	1.3 o/o
Esfingomielina	10.4 o/o	15.0 o/o	16.9 o/o	18.0 o/o
Fosfatidilcolina	29.2 o/o	44.8 o/o	37.0 o/o	40.0 o/o
Fosfatidilinositol	6.7 o/o	8.7 o/o	4.2 o/o	6.1 o/o
Fosfatidilserina	7.8 o/o	14.4 o/o	9.1 o/o	11.2 o/o
Fosfatidiletanolamina	26.8 o/o	41.6 o/o	26.0 o/o	29.1 o/o

El Cuadro III presenta los valores obtenidos de 5 quechuas, 5 aymaras y 10 franceses, estos resultados evidencian que el Calcio y Magnesio influyen positivamente en la renovación parcial de fosfolípidos incrementándose este intercambio de moléculas. Por el contrario, el EDTA, la glucosa, cianuro de potasio y la mezcla de estos dos últimos inhiben parcialmente esta renovación en todas las poblaciones estudiadas.

La suspensión plaquetaria está constituida de 15 mg de plaquetas frescas en 0.5 ml de tampón fisiológico más la molécula marcada correspondiente, 50 uI de (me-

CUADRO III

PORCENTAJE DE INCORPORACION DE BASES MARCADAS EN FOSFOLIPIDOS BAJO LA INFLUENCIA DE CIERTAS MOLECULAS

Moléculas añadidas a la suspensión plaquetaria* más la molécula marcada correspondiente	Fosfatidilserina		Fosfatidiletanolamina		Fosfatidilcolina	
	Aymara Quechua	Francesa	Aymara Quechua	Francesa	Aymara Quechua	Francesa
Testigo (suspensión plaquetaria más molécula marcada)	5.9	6.1	7.9	8.1	8.2	8.2
Cloruro de Ca 1.25 uM	8.6	8.8	11.2	11.3	11.0	11.3
Cloruro de magnesio 1.25 uM	7.7	7.5	10.1	10.0	10.3	9.8
Glucosa 2.5 uM	5.8	5.4	6.9	3.2	8.0	7.8
Glucosa 2.5 uM E.D.T.A. 0.4 uM	3.3	3.0	3.7	3.4	3.1	3.5
Cianuro de Potasio 0.5 uM	2.1	2.5	3.0	3.2	3.1	3.3
Cianuro de Potasio 0.5 uM Glucosa 2.5 uM	4.1	3.9	4.0	3.8	4.1	4.4

til C14) cloruro de colina 0.52 uCi/0.01 uM; 40 uL de (2C14) etan 1 ol 2 cloruro de amina 0.2 uCi/0.01 uM y 50 uL de DL (3-C14) serina 0.5 uCi/0.01 uM. Incubación de dos horas.

DISCUSION

La concentración de ciertas biomoléculas séricas no modifican el metabolismo fosfolípido de las plaquetas sanguíneas, en efecto la disfosfolipidemia sérica en aymaras, quechuas, habitantes de grandes alturas (1) no parece influir en la concentración de los fosfolípidos plaquetarios, puesto que en estas células son otros los fosfolípidos que sufren alteraciones cuantitativas.

La renovación de la parte polar de fosfolípidos plaquetarios se realiza por el intercambio de moléculas homólogas de su medio ambiente; "in vitro", utilizando plaquetas frescas observamos que los fosfolípidos de poblaciones aymaras y quechuas intercambian sus moléculas polares en las mismas proporciones, razón por la que los agrupamos en una sola población; este intercambio de moléculas es también semejante en la población francesa, intercambiándose la colina con la base del fosfolípido plaquetario en mayor cantidad que la etanolamina y esta última en mayor cantidad que la serina.

El incremento del intercambio molecular "in vitro" de la colina, serina y etanolamina, con las moléculas más polares de los fosfolípidos en presencia de calcio y magnesio en las poblaciones aymaras, quechuas y france-

sas es semejante. Como a menores concentraciones de estos iones, el intercambio es menor, pensamos que el ligero descenso de magnesio sérico en aymaras y quechuas encontrado por Henrotte y col (7), influiría in vivo en la renovación parcial de fosfolípidos plaquetarios de estas dos poblaciones; de igual manera la glucosa a diferentes concentraciones inhibe la renovación parcial de fosfolípidos, en proporciones semejantes en las tres poblaciones; por lo que se supone que la relativa hipoglicemia en quechuas (6) tendría también su influencia in vivo, en el metabolismo de los lípidos estudiados. El intercambio de biomoléculas fosfolípídicas parecería no necesitar energía, por cuanto la glucosa disminuye el recambio de moléculas polares; para confirmar el efecto de la glucosa; se añadió al medio que contenía 2.5 uM de glucosa, una quinta parte de cianuro de potasio (antagonista de la glucosa) y el intercambio aumentó en relación al medio que contenía solo glucosa.

La dieta de poblaciones aymaras y quechuas es rica en hidratos de carbono por lo que podría suponer que estas moléculas serían utilizadas en la síntesis de proteínas, puesto que se observa al menos a nivel sérico, cantidades bajas de glucosa y casi todos los lípidos.

En vista de que los fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) más activos y participantes responsables de la agregación plaquetaria, se encuentran en las mismas concentraciones en poblaciones con menor y mayor predisposición a las enfermedades trombóticas y que la renovación parcial de fosfolípidos y la influencia

de ciertas moléculas en esta reacción es semejante en las tres poblaciones estudiadas; nos da lugar a otras perspectivas de estudio a nivel de lípidos y sería el análisis de los ácidos grasos especialmente del ácido araquidónico y sus

derivados como ser las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina, biomoléculas que intervienen directa o indirectamente en los procesos de regulación trombótica.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- BELLIDO, D., DOUSSET, N., DOUSTE-BLAZY, L., DROUET, L. et CAEN J. Lipides sériques des sujets boliviens. Analyse des pre-B lipoprotéines. Les Colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Anthropologie des populations andines. Inserm, 63: 497-504, 1976.
- 2.- BELLIDO D., GONZALES I. Acidos grasos séricos en aymaras, quechuas y migrantes habitantes a grandes alturas. Archivos de Biología Andina, (En prensa).
- 3.- CAEN J.P., DROUET L., BELLANGER R., MICHEL H. and HENON P. Thrombosis, platelet behaviour, fibrinolytic activity and diet on the Andes Plateau. Dietary Fats and Thrombosis, INSERM Symposium Lyon Hemostasis 2: 13-20 (1973/74).
- 4.- CHEN y col. Microdetermination de phosphorus Anal. Chem, 28: 1956-1758, 1956
- 5.- CLEMENT NOEL, YVES L. MARCEL and JEAN DAVIGNON. Plasma phospholipids in the different types of primary hyperlipoproteinemia. J. Lab. Clin. Med. 611-620, 1972.
- 6.- GARMENDIA FL., ARROYO J. y MURO, M. Glicemia del nativo normal de altura Inst. Biol. Andina 3 (5-6) 209-216, 1970.
- 7.- HENROTTE J.G., DEPRAITERE Y RUFFIE J. Elionograma sanguíneo de las poblaciones amerindias del corredor interandino y los procesos adaptativos. Anuario del Instituto Boliviano de Biología de Altura, 78-82, 1979.
- 8.- LUSCHER E.F. The effects of lipids and fatty acids on blood coagulation and platelets in relation to thrombosis. Adv. Exp. Med. Biol. 60: 107-118, 1975.
- 9.- MACLOUF J., BORGEAT P., GRANGE M.J., WAUTIER, J.L., CAEN J.P. Prostaglandines, thromboxanes leucotrienes. Leur role dans les maladies cardio-vasculaires, les reactions allergiques et l'inflammation. La Presse Médicale, 13 (2): 91-96, 1984.
- 10.- ROBERT S., LEES and ANGELINA C.A. CARVALHO Hypercholesterolemia and platelets. The thrombotic process in atherogenesis. Edited by Chanler, Eurenium, McMillan, Nelson, Schwartz and Wessler (Plenum Publishing Corporation) 301-307, 1978.