

Fibronectina plasmática en el habitante de la altura (3.600 m), su rol en la agregación de las plaquetas sanguíneas

Aida Quintela - Armando Rodríguez
Miriam de Chávez

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA

ABSTRACT

Previous studies have shown that high altitude residents are less prone to thrombotic accidents due to the hypoaggregability of their platelets (1).

In 1974, Klebe (2) described a glycoprotein in serum "fibronectine", which is necessary to fix the cells to the collagene. It has also been observed that the platelets of sea level natives, washed and resuspended in plasma wich had been deprived of its fibronectine, did not aggregate with different inductors like ADP, collagene, arachidonic acid, like they aggregated with the initial plasma (3). The present paper tries to demonstrate that the hypoaggregability of the platelets of high altitude natives is related to a fibronectine deficiency.

Fibronectine in the plasma of high altitude natives was measured and a concentration of 0.24 mg per ml was found which is less than in sea level natives. The modification of platelet aggregation was evaluated in relation to the amount of purified fibronectine added. It was observed that the blood platelets regained the aggregability with different inductors when purified human fibronectine was added; therefore the hypoaggregability is explained by the lower level of fibronectine in high altitude natives.

RESUMEN

Estudios previos mostraron que debido a la hypoagregabilidad plaquetaria de los habitantes de la altura estos estan menos expuestos a accidentes trombóticos (1).

En 1974 Klebe (2) describió una glicoproteína sérica "fibronectina" (FNp) que es necesaria para la fijación de las células al colágeno. Se ha visto también que las plaquetas de sujetos del nivel del mar lavadas y resuspendidas en plasmas privados de su FN, no agregaban con los diferentes inductores (ADP, Colágeno, Acido Araquidónico) como agregaban con el plasma inicial (3). Este trabajo trata de demostrar si la hypoagregabilidad plaquetaria de los habitantes de la altura estaría relacionada a un déficit de FNp. Se ha hecho un dosaje en el plasma de estos sujetos encontrándose una concentración de 0.24 mg. de fibronectina

por ml (tasa de menor a la de sujetos del nivel del mar) y un estudio de la modificación de la agregación plaquetaria en relación a la tasa de fibronectina purificada añadida. Se observó que las plaquetas sanguíneas recuperaban la agregabilidad con diferentes inductores, al añadir FNp purificada; se explica entonces la hypoagregabilidad por la tasa disminuída de FNp en los habitantes de la altura.

INTRODUCCION

La fibronectina es una glicoproteína de peso molecular 440.000 daltones, presentándose como un dímero compuesto de dos sub-unidades de peso molecular 220.000 cada una, asociadas por puentes disulfuro. Se ha podido demostrar por técnicas de inmunofluorescencia que la fibronectina está ligada en el plasma, no solo al fibrinógeno, sino también al FVIII C, además al igual que éste, la fibronectina es sinteti-

zada por las células endoteliales que la secretan a la matriz extracelular.

Engval y col. (4) han mostrado que la fibronectina tiene una gran afinidad por el colágeno, actuaría como un mediador de la adhesión celular in vivo e in vitro, formando un puente entre el colágeno y la superficie celular (5).

La tendencia de este trabajo, ha sido determinar si la hipoadhesión plaquetaria que existe en el habitante de la altura, estaría relacionada a un déficit en la tasa de FNp de estos sujetos.

Nuestro trabajo comprende dos partes:

1. Purificación de la fibronectina plasmática y su dosaje en el plasma del habitante de la altura.
2. Estudio de la agregación plaquetaria y su modificación al añadir FNp purificada.

PRIMERA PARTE

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en 16 sujetos de edad comprendida entre 35 y 40 años, 12 hombres y 4 mujeres.

Purificación

La fibronectina ha sido purificada por cromatografía de afinidad (6) siguiendo las siguientes etapas:

1. Cromatografía del plasma sobre una columna de sefarosa en (S4B).
2. Cromatografía de afinidad sobre gelatina/sefarosa.
3. 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%. La sangre fué centrifugada a 1.000 rpm 15' a temperatura de 15°C, se separó el sobrenadante plasmático rico en plaquetas (PRP), el que ha sido centrifugado durante ciento cincuenta segundos a 10.000 rpm 20°C., para obtener PPP con el que se realizaron todas las pruebas de cromatografía para obtener la fibronectina. La FN así aislada es dializada y concentrada a 5 o 3 ml para ensayarla hasta obtener una D.O. a 280 nm próxima a 1.000. La concentración de 0.6 mg/ml de FN corresponde a una D.O. de 0.440 a 280 nm.

La pureza de la FNp ha sido verificada, por electroforesis analítica (7).

Dosaje de FNp

Una vez concentrada la FNp eluida de la columna de sefarosa/gelatina, se dosificó por la técnica de Laurell (8).

El plasma obtenido después del paso sobre la columna de sefarosa/gelatina, esta desprovisto de FN y fue utilizado para los estudios de agregación plaquetaria.

RESULTADOS

Se observa que la FNp de los habitantes de la altura, presenta una sola banda de alto peso molecular. Después de reducción por el beta-mercaptoethanol, se obtuvo una banda de peso molecular aproximado 220.000 daltones.

Recuperación

Por esta técnica nosotros hemos recuperado 0.24 mg. de fibronectina por ml de plasma de partida (promedio de 16 purificaciones) valor muy bajo en relación al encontrado en los sujetos del nivel del mar. Ya que en el trabajo realizado el año 1980 en sujetos franceses, se ha encontrado 0.49 mg de FN por ml de plasma de partida, valor muy próximo a los resultados de Vuento y Vahery (5) que encontraron 0.45 mg. por ml.

SEGUNDA PARTE

ESTUDIO DE LA AGREGACION PLAQUETARIA

La agregación plaquetaria, estudia la respuesta de las plaquetas a diferentes agentes agregantes, midiendo las variaciones de transmisión óptica del medio en el cual están en suspensión (plasma o tampón).

Método

La sangre ha sido tomada de la vena cubital de personas voluntarias, utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3.8% a razón de un volumen para 9 volúmenes de sangre, o ACD pH 4.5, un volumen, para 6 volúmenes de sangre. Este anticoagulante es utilizado para lavar y aislar las plaquetas sanguíneas.

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 ADP y Colágeno.

La agregación comienza al añadir en la suspensión de plaquetas en PPP desprovisto de FN y en el PRP de los sujetos de la altura, ADP (2,5 ul) 10 ul, y colágeno 500 mg/ml 50 ul. La agregación se traduce por un aumento de la transmisión óptica del haz luminoso a través de la cubeta, aumento detectado en un registrador acoplado al agregómetro.

Resultados

1. Se observa en la tabla I, que las plaquetas resuspendidas en PPP desprovisto de FN, no reaccionan con los agentes agregantes, pero recuperan su actividad inicial cuando la FN aislada es añadida.

2. El PRP de los sujetos de la altura, reacciona débilmente con los diferentes inductores de la agregación, observándose un marcado aumento de la actividad de las plaquetas que se traduce en el incremento del porcentaje de la velocidad de agregación plaquetaria, al añadir FNp purificada a este plasma.

DISCUSION

La tasa de FNp en el hombre ha sido reportada en diversas circunstancias clínicas, el punto común de estas afecciones es la descarga en la circulación sanguínea de partículas (microagregados fibrinosos, residuos tisulares), cuya depuración está a cargo en una mayor parte de las células del sistema retículo endotelial. La FNp intervendría en esta depuración en ayuda de la fagocitosis, considerando lógicamente un incremento del catabolismo de la molécula responsable de su tasa baja en el plasma. Sin embargo otros mecanismos, tales como una fuga proteica extravascular o una reducción de síntesis ligada o no a la desnutrición, pueden asociar el catabolismo incrementado para explicar la reducción observada en la tasa plasmática (10) (11).

Teniendo en cuenta que nosotros hemos hecho

el estudio en sujetos normales de la altura.

Se observa.

1. Que la FNp juega un rol importante en la agregación plaquetaria, pues las plaquetas normales resuspendidas en PPP desprovisto de fibronectina, pierden su agregabilidad con los diferentes inductores (ADP, Colágeno) pero la recuperan al añadir a estos plasmas FNp purificada.
2. Encontrándose disminuída la tasa de FNp en el habitante de la altura, que es de 240 mg/1 con relación a la de los sujetos del nivel del mar en quienes alcanza de 300 a 400 mg/1, se explica que una de las razones para la hipoagregabilidad plaquetaria de aquellos sujetos es la deficiencia de FNp, ya que las plaquetas se activan al añadir FNp purificada a sus plasmas, observándose un aumento del 40% en la velocidad de agregación.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Cooperación Francesa por proporcionarnos los reactivos necesarios para la ejecución de presente trabajo y a la Sra. Carmen de Bohórquez por su trabajo de secretaria.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CAEN J.P., DROUET L., RODRIGUEZ A., MICHEL H., BEDROUEX R. Etude de Fonctions plaquetaires et de coagulation chez les amerindiens vivant en haute altitude.
- 2.- KLEBE R.J. Isolation of collagen dependent cell attachment factor. Nature (London) 250-240, 1974.
- 3.- QUINTELA A., FAUVEL F., CAEN J.P. Extracción y purificación de la fibronectina plasmática, su efecto en la agregación de las plaquetas sanguíneas humanas por diferentes inductores. Anuario IBBA: 83-90. 1983-1984.
- 4.- ENGVAL E., RUOSLAHTI E., MILLER E.J. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. Exp. Med: 147: 1584, 1978.
- 5.- RUOSLAHTI E., ENGVAL E. Inmunochemical and collagen binding of different genetic types and to fibrinogen. Ann N.Y. Acad. Sci. U.S.A. 312: 178, 1978.
- 6.- VUENTO M., VAHERI A. Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non denaturing conditions. Biochem, J. 183: 331, 1974.
- 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 protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem, 15: 45, 1966.
- 9.- BORN G.V.R., CROSS M.H. The aggregations of blood platelets. J. Physiol (London) 168: 78, 1963.
- 10.- GENESTAL M., SIE P., HUGOT B., CATHALA B., BONEU B., LARENG L. Fibronectine Plasmatique. Son role dans l'infestation severe en reanimation. La Presse Médicale - Tome 12, N° 18 1155, 1983.
- 11.- PIERROT M., HABIBI B., ALLAIN J.P., FABRE F., CAS-TERAN R. Fibronectine humaine dans le traitement des états septiques. La Presse Médicale, Tome 14 - N° 2: 79, 1985.

T A B L A N º 1

ESTUDIO DE LA AGREGACION PLAQUETARIA DE SUJETOS DE LA ALTURA 3.600 m

| Medio de resuspensión de plaquetas | Agregación agregante | Volumen añadido | Velocidad de agregación plaquetaria |
|--|----------------------|-----------------|-------------------------------------|
| PPP desprovisto de fibronectina | ADP 2,5 uM | 10 ul | 0.3 % |
| | Colágeno 500 mg/ml | 50 ul | 0 % |
| PPP desprovisto de fibronectina + 100 ul de fribronectina purificada | ADP 2,5 uM | 10 ul | 22 % |
| | Colágeno 500 mg/ml | 50 ul | 24 % |
| PRP | ADP 2,5 uM | 10 ul | 37,7 % |
| | Colágeno 500 mg/ml | 50 ul | 33,3 % |
| PRP + 100 ul de fibronectina purificada | ADP 2,5 uM | 10 ul | 42,5 % |
| | Colágeno 500 mg/ml | 50 ul | 46,6 % |