

Liberación del factor plaquetario 4 inducido por ADP, trombina y colágeno

A. Domingo-Albós, M.^a D. Doménech-Mateu y R. Castillo-Cofiño

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
Barcelona

(Recibido el 4 de octubre de 1972)

A. DOMINGO-ALBOS, M.^a D. DOMENECH-MATEU and R. CASTILLO-COFIÑO. *Liberation of Platelet Factor 4 During the Platelet Aggregation Induced by ADP, Thrombin and Collagen Fibres*. R. esp. Fisiol., 29, 11-16. 1973.

The liberation of PF-4 under the action of ADP, thrombin and collagen fibres has been determined in human platelet rich plasma.

Platelet aggregation was first induced with the different agents, and then the PF-4 liberated during the aggregation was evaluated.

Thrombin, at concentrations which imply a strong plasma coagulation, causes a nearly complete liberation of PF-4 since it is accompanied by a platelet lysis. However, lower concentrations of thrombin such as to cause a weak plasmatic coagulation and/or a reversible platelet aggregation, only provokes a partial liberation of PF-4.

High concentrations of ADP only produce a partial liberation of PF-4, with presence of some refractory cases which do not respond to the liberating stimulus. The ADP, when causing a reversible platelet aggregation, does not provoke the liberation of PF-4.

Collagen fibres produce a strong liberation of PF-4 similar to the one obtained with high concentrations of thrombin.

Durante la agregación de las plaquetas tiene lugar la denominada «reacción de liberación», en la que se vierten al medio diversos componentes intraplaquetarios, entre los que se encuentra el factor plaquetario 4 (FP-4). Este factor, ubicado en los gránulos α de las plaquetas, resulta ya expulsado al medio circundante en las fases iniciales de la agregación (7, 9).

El FP-4 posee una doble actividad biológica, ya que actúa, por una parte, neutralizando a la heparina (factor antiheparínico

de las plaquetas), y, por otra, estabilizando y precipitando los monómeros de fibrina (factor plaquetario estabilizante de la fibrina); debido a estas funciones se presupone que desarrolla un importante papel en la hemostasia primaria y mecanismos de la coagulación. En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, se sabe se trata de una glicoproteína termoestable de reducido peso molecular (3).

En el presente trabajo se ha pretendido valorar, a través de su actividad antihepa-

rínica, el FP-4 liberado por la acción del adenosín difosfato (ADP), de la trombina y de las fibras de colágeno, agentes agregantes que pueden ser considerados fisiológicos y que actúan sobre las plaquetas por mecanismos diferentes (1, 5, 6).

Material y métodos

Las investigaciones se efectuaron en un total de 45 plasmas procedentes de otras tantas personas sanas. En todos los casos se procedió primero a la inducción de la agregación plaquetaria y luego a la determinación del FP-4 liberado durante la agregación.

INDUCCIÓN DE LA AGREGACIÓN Y LIBERACIÓN DEL FP-4. Se utilizó el siguiente material:

Agregómetro de Born,* con dispositivo de agitación magnético y circuito de agua caliente.

Plasma rico en plaquetas (PRP), obtenido a partir de sangre citratada centrifugando a 1.500 r.p.m. durante 3 a 4 minutos. Se procuró que el número de plaquetas estuviera comprendido entre 200.000 y 300.000 por milímetro cúbico.

Plasma pobre en plaquetas (PPP), obtenido a partir de sangre citratada centrifugando a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos. Procediendo de esta manera, el número residual de plaquetas suele ser inferior a 20.000 por milímetro cúbico.

Agentes agregantes, que fueron utilizados disueltos en tampón de Michaelis:

Adenosín difosfato (Boehringer), a las concentraciones finales de 2,4, 1,2 y 0,6 microgramos por mililitro.

Trombina (Ortho), a las concentraciones finales de 2, 0,3 y 0,2 U por mililitro.

Fibras de colágena purificadas (Stago), a la concentración final de 40 microgramos por mililitro.

Previa calibración del aparato con PRP y PPP, la *agregación plaquetaria* se realizó a 37° C, colocando en un tubo de vidrio siliconado 0,8 ml de PRP y 0,2 ml del agente agregante correspondiente, momento en que se puso en marcha el dispositivo magnético de agitación. El desarrollo de la agregación se mantuvo en todos los casos durante 5 a 6 minutos.

VALORACIÓN DEL FP-4 LIBERADO. PRP agregado, obtenido con los distintos agregantes, se recogió y centrifugó a 3.500 revoluciones por minuto durante 5 minutos, obteniéndose un PPP con el FP-4 liberado durante la agregación. Este plasma se calentó a 60° C durante 10 minutos, para precipitar el fibrinógeno y neutralizar otros posibles factores antiheparínicos diferentes del FP-4; luego se centrifugó a 3.500 revoluciones por minuto durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

PPP de cada caso que se calentó y preparó de la misma forma indicada anteriormente para el PRP agregado.

Plasma sustrato, constituido por una mezcla de varios plasmas desplaquetizados procedentes de donantes normales.

Tampón de Michaelis, pH 7,35 (2).

Heparina desecada (Choay) a la concentración de 2 U/ml.

Trombina (Stago), a la concentración de 10 U/ml.

Método. Se utilizó, con algunas variantes, el método seguido por FARBISZEWSKI *et al.* (4) para determinar el FP-4 circulante en plasma. Para cada caso se procedió a determinar, a 37° C, el tiempo de trombina heparina de los siguientes sistemas:

Sistema I (Control): Mezcla de 0,3 ml de plasma sustrato, 0,1 ml de tampón, 0,1 mililitro de la disolución de heparina y 0,1 ml de la disolución de trombina. En el momento de añadir la trombina se iniciaba la medida del tiempo.

Sistema II: Como el sistema I, sustituyendo el tampón por 0,1 ml de PPP calentado.

* Departamento de Farmacología. Royal College of Surgeons, Londres (Inglaterra).

Sistema III: Como el sistema I, sustituyendo el tampón por 0,1 ml de una mezcla de 0,8 ml de PPP calentado con 0,2 ml de tampón.

Sistema IV: Como el sistema I, sustituyendo el tampón por 0,1 ml de PRP agregado y calentado.

Resultados

EFFECTOS AGREGANTES DE LOS DIFERENTES AGENTES

El ADP produjo, a la concentración de 2,4 $\mu\text{g/ml}$, una intensa agregación de las plaquetas sin desagregación posterior; a 1,2 $\mu\text{g/ml}$, una doble onda de agregación, la segunda reflejo gráfico de la reacción de liberación, y a 0,6 $\mu\text{g/ml}$, una agregación plaquetaria menos intensa, seguida de una rápida desagregación (fig. 1).

La trombina produjo, a la concentración de 2 U/ml, una rápida e intensa coa-

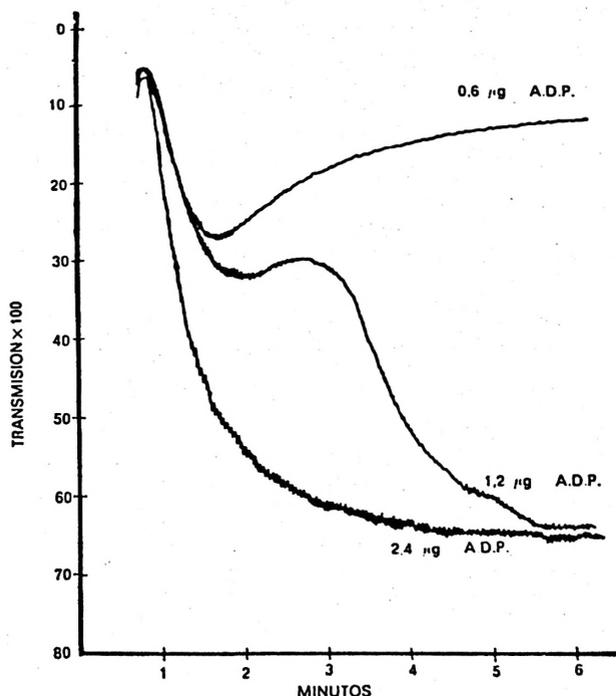


Fig. 1. Curvas de agregación plaquetaria obtenidas con ADP a distintas concentraciones.

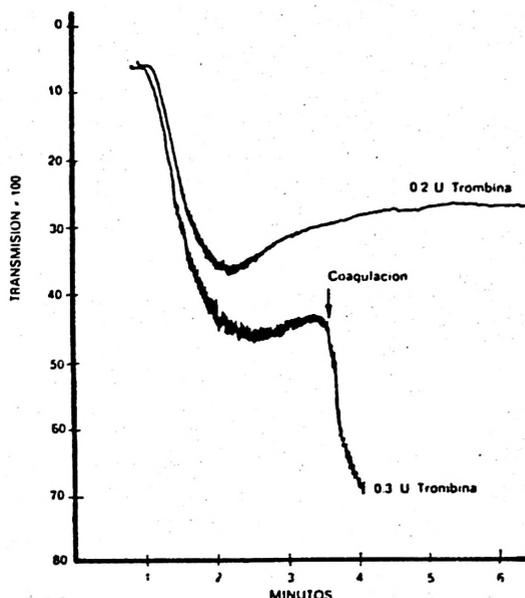


Fig. 2. Curvas de agregación plaquetaria obtenidas con trombina a distintas concentraciones.

gulación del PRP que apenas daba tiempo a que pudiera observarse la agregación plaquetaria; con 0,3 U/ml, una intensa agregación plaquetaria, seguida, al cabo de 1,5 a 3 minutos, de una débil coagulación del PRP, y con 0,2 U/ml, una agregación plaquetaria reversible, sin coagulación o con una coagulación lenta y muy débil del PRP al cabo de 4 a 5 minutos (fig. 2).

Las fibras de colágena produjeron una agregación plaquetaria irreversible después de un período de latencia de uno a dos minutos (fig. 3).

FP-4 LIBERADO DURANTE LA AGREGACIÓN

La valoración del FP-4 liberado durante la agregación se efectuó comparando los tiempos de trombina heparina obtenidos con PPP+tampón (sistema III) y PRP agregado (sistema IV). Con el método utilizado en estas investigaciones, el margen de error de la técnica resultó ser de ± 2 segundos, por lo que se consideró que hubo liberación de FP-4 cuando las diferencias

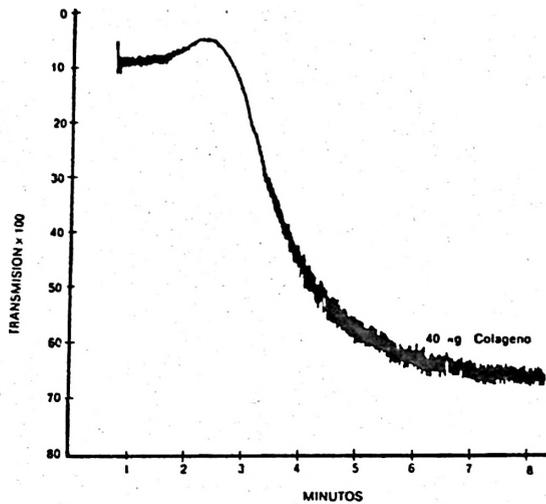


Fig. 3. Curva de agregación plaquetaria obtenida con fibras de colágeno.

El espacio inicial sin cambios en la transmisión óptica corresponde al período de adhesión de las plaquetas.

de tiempo de coagulación entre los dos sistemas fueron superiores a dos segundos.

Al mismo tiempo, comparando los tiempos de trombina heparina obtenidos con PPP (sistema II) y tampón (sistema I), se pueden valorar los niveles plasmáticos normales de FP-4, que son el resultado de la destrucción intravascular fisiológica de las plaquetas.

Liberación del FP-4 inducida por ADP. Los PRP agregados con ADP, a la concentración de 2,4 $\mu\text{g/ml}$ (tabla I), dieron un tiempo medio de coagulación de 31,8 segundos y una diferencia de 5,2 seg con respecto al obtenido con PPP+tampón ($p < 0,001$). En dos casos no hubo liberación y fue dudosa en otros dos.

Con 1,2 $\mu\text{g/ml}$, el tiempo medio de coagulación fue de 33,6 seg, es decir, 3,4 seg inferior al obtenido con PPP + tampón ($p < 0,001$). A esta concentración de ADP el número de casos que no liberaron FP-4 fue mayor (6, y dudoso 1).

Con 0,6 $\mu\text{g/ml}$, el tiempo medio de coagulación resultó prácticamente igual al obtenido con PPP+tampón ($p < 0,9$), lo que indica que en ningún caso hubo liberación de FP-4.

Liberación del FP-4 inducida por trombina. Los PRP coagulados con 2 U/ml de trombina liberaron todos FP-4, resultando un tiempo medio de coagulación de 28 seg (tabla I), es decir, 14 seg menos que el obtenido por PPP+tampón ($p < 0,001$).

Con 0,3 U/ml, liberaron también todos FP-4; sin embargo, el tiempo medio de coagulación fue de 33,6 seg, es decir, sólo 8,4 seg menos que el obtenido con PPP+tampón ($p < 0,001$), indicativo de que sólo hubo una liberación parcial de FP-4.

Con 0,2 U/ml dieron un tiempo medio

Tabla I. Liberación del FP-4 inducida por ADP, trombina y colágeno.

Control	PPP	Tiempo de trombina-heparina (seg)		
		PPP tampón	PRP agregado	
58,0	33,6	37,0	ADP $\mu\text{g/ml}$	
			2,4	31,8
			1,2	33,6
57,5	36,5	42,0	0,6	37,1
			Trombina U/ml	
			2,0	28,0
58,5	40,0	44,2	0,3	33,6
			0,2	38,3
			Colágeno $\mu\text{g/ml}$	
			40,0	30,5

de coagulación de 38,3 seg, es decir, sólo 3,7 seg inferior al obtenido con PPP+tampón ($p < 0,02$). A esta concentración de trombina, fueron seis los casos que no liberaron FP-4.

Liberación del FP-4 inducida por colágeno. Todos los PRP agregados con fibras de colágeno liberaron FP-4 (tabla I). El tiempo medio de coagulación resultó de 30,5 seg, es decir, 13,7 seg inferior al obtenido con PPP+tampón ($p < 0,001$).

Discusión

Es conocido que las plaquetas, durante la agregación inducida por trombina y fibras de colágeno, se desintegran, perdiendo su individualidad estructural, en un proceso irreversible, denominado de trombocitolisis; en cambio, durante la agregación inducida por ADP las plaquetas suelen conservar sus límites y los cambios funcionales que sufren pueden ser reversibles (8).

Relacionando estos hechos con los resultados del presente trabajo, se puede admitir que los valores obtenidos con la trombina a elevadas concentraciones y con las fibras de colágeno, representan el FP-4 total o completamente liberado. En cambio, si la trombina se emplea a concentraciones que provocan una coagulación débil y/o una agregación reversible de las plaquetas, se produce sólo una liberación parcial del FP-4.

El ADP, incluso empleado a elevada concentración, únicamente provoca una liberación parcial de FP-4, existiendo algunos casos que no responden en absoluto al estímulo liberador. Este agente, a diferencia de la trombina, cuando causa una

agregación reversible de las plaquetas no provoca la liberación de FP-4.

Resumen

Efectuado en plasma humano rico en plaquetas, se demuestra que las fibras de colágeno y la trombina empleada a elevada concentración provocan una intensa liberación de FP-4 que puede calificarse de total o completa. En cambio, con la trombina empleada a concentraciones reducidas, causantes de una coagulación plasmática débil y/o una agregación reversible de las plaquetas, únicamente se produce una liberación parcial de FP-4.

El ADP solo provoca una liberación parcial del FP-4, existiendo algunos casos refractarios. Este agente, a diferencia de la trombina, cuando causa una agregación reversible de las plaquetas no provoca la liberación de FP-4.

Bibliografía

1. CAEN, J., LEGRAND, Y. y VERHEECKEN, N.: *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 13, 1028, 1968.
2. CAEN, J., LARRIEREN, M. y SAMAMA, M.: L'hémotase. L'Expansion Scientifique, Paris, 1968.
3. DEUTSCH, E. y LECHNER, K.: *Biochemistry of blood platelets*. Acad. Press., Londres-Nueva York, 1967.
4. FARBISZEWSKI, R., NIEWIAROWSKI, S., WOROWSKI, K. y LIPINSKI, B.: *Thrombos. Diath. Haemorrh.*, 24, 578, 1968.
5. GAARDER, A., JONSEN, J., LALAND, S., HELLEN, A., y OWREN, P. A.: *Nature*, 192, 531, 1961.
6. HASLAM, R. J.: *Nature*, 202, 765, 1964.
7. NIEWIAROWSKI, S., LIPINSKI, B., FARBISZEWSKI, R. y POPLAWSKI, A.: *Experientia*, 24, 343, 1968.
8. RODMAN, N. F.: *The platelet*. Williams-Wilkins Company, Baltimore, 1971.
9. YOUSSEF, A. y BARKHAN, P.: *Brit. Med. J.*, 1, 746, 1968.

