

## Contribución al reconocimiento de la hiperfunción plaquetaria en clínica

Miguel Ingelmo Morin

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

78 ING



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

SECRETARIADO DE PUBLICACIONES  
INTERCAMBIO CIENTÍFICO Y EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

**«Contribución al reconocimiento  
de la hiperfunción plaquetaria en clínica»**

Resumen de la Tesis presentada para aspirar  
al grado de Doctor en Medicina

por

MIGUEL INGELMO MORIN

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Tesis doctoral del Dr. D. MIGUEL INGELMO MORIN**

**Tema:**

**«CONTRIBUCION AL RECONOCIMIENTO DE LA HIPERFUNCION  
PLAQUETARIA EN CLINICA»**

**TRIBUNAL DE TESIS**

**Presidente:**

**Dr. D. DIEGO RIBAS MUJAL**  
Catedrático de Histología y Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

**Vocales:**

**Dr. D. J. PIÑOL AGUADE**  
Catedrático de Dermatología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

**Dr. D. J. GIBERT-QUERALTO**  
Catedrático de Patología y Clínica Médica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

**Dr. D. A. BALCELLS GORINA**  
Catedrático de Patología General  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

**Dr. D. C. ROZMAN BORSTNAR**  
Catedrático de Patología y Clínica Médica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

**Director:**

**Dr. D. A. BALCELLS GORINA**  
Catedrático de Patología General  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

Realizada la presentación y lectura de la Tesis, en fecha 5 de diciembre de 1972, obtuvo la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE.

(Sello de la Facultad)

Barcelona, 7 de octubre de 1976

**EL VICEDECANO**  
**JOSE TRASERRA PARAREDA**

## OBJETO DE LA TESIS

En esta tesis, fruto de cinco años de trabajo, en los laboratorios de Hemoterapia y Coagulación así como en el de Bioquímica pretendemos el estudio y puesta a punto de las técnicas necesarias para medir algunas de las funciones plaquetarias; aplicación clínica en enfermos con sospecha de padecer procesos trombóticos y con ello su posible profilaxis así como su modificación en trombosis constituidas. Por fin interrelación entre lípidos y funciones plaquetarias.

Dentro de las funciones plaquetarias hemos estudiado la adhesividad y la agregación. Estas dos funciones en dos grupos de sujetos sanos y enfermos con predisposición o trombosis constituidas. Dentro de los enfermos predispuestos hemos estudiado arterioesclerosis, diabetes, enf. infecciosas, cáncer, cor pulmonale. Entre los sanos, hemos estudiado mujeres que tomaban anticonceptivos (combinación de d,1 norgestrel 0,5 mgs. y etinilestradiol 0,05 mgs.).

En el estudio lipídico se midieron por métodos químicos las cifras de lípidos totales, colesteroína, triglicéridos, las lipoproteínas por electroforesis en acetato de celulosa y cromatografía en capa fina. Esta última nos ha servido para control de las determinaciones químicas.

Se utilizó un inhibidor de la agregación «in vitro» dipiridamol para intentar sensibilizar la prueba y para comprobar si habría efectos diferenciales sobre la agregación plaquetaria en individuos normales y en los diferentes enfermos.

Junto con el Prof. Castillo estudiamos los efectos del Dipiridamol «in vitro», en sujetos sanos con medidas de la agregación previa y a las dos horas de 10 mgs. intramuscular.

## INTRODUCCION

Uno de los más graves problemas con los que se enfrenta la medicina actual son las trombosis en diferentes vasos de nuestro organismo. Dentro de este campo la hiperfunción plaquetaria adquiere un papel patogenético importante. Mi vocación de clínico semiólogo, heredada del Prof. Balcells Gorina con el que he hecho este trabajo y el hecho de que la profilaxis era casi nula en estos enfermos nos movieron al estudio de la semiología funcional plaquetaria en relación con la clínica.

No hubiera sido posible este trabajo sin la ayuda al comienzo, del Dr. A. Ríos González y luego en todo él, de los Profesores R. Castillo Cofiño y A. Cominas Vilardell. Al Prof. J. Riverola le debemos el estudio estadístico.

La tesis consta de una parte teórica en la que se pone al día la fisiopatología plaquetaria, interrelación plaquetas-vaso y el metabolismo lipídico y una parte experimental con métodos, técnicas y su valoración así como la correlación de los diversos parámetros hecha por análisis factorial.

En nuestra investigación al comienzo hicimos dos técnicas de adhesividad, descartando después la técnica de Borgrewink, utilizando la de Breddin.

Con respecto a la agregación al principio por no tener otros medios la estudiamos por un método fotométrico sin control de temperatura. Se estudiaron 100 enfermos que no han sido incluidos en la tesis, pues creemos que las deficiencias técnicas no nos permitían valorar bien la agregación. Por deferencia del Prof. Born, contamos ya con el agregómetro construido manualmente por él, con control de temperatura y son los resultados que hemos correlacionado por análisis factorial.

## MATERIAL Y METODOS

*Adhesividad:* Hemos utilizado preferentemente la técnica de Breddin (1), que mide la adhesividad «in vitro»; creemos que es una técnica sencilla y que no necesita instrumental especial. Es valorable realizando la extensión en dos cámaras para cada individuo a explorar, y al menos diez recuentos por cámara con objeto de reducir al mínimo el error. Se le han achacado errores por la aglutinación que dificultaría el conteo, pero en nuestra experiencia salvo errores, ocurre pocas veces y la zona de cámara en la que ocurre se desprecia. Para Wright (2) sería una agregación debida a la solución salina del citrato sódico; pienso que las técnicas actuales de adhesividad-agregación miden éstas dos funciones y creemos que desde un punto de vista funcional plaquetario son difíciles de reparar.

También estudiamos esta función, con la técnica de Borgrewink (3) modificada por García San Miguel (4); los resultados no son en absoluto parangonables y pensamos con varios autores (5, 6) que con esta técnica se valora globalmente el primer tiempo de la hemostasia y por tanto es menos selectiva de esta función. El conteo diferencial es otro punto en el que se pueden cometer errores.

*Agregación:* Al comienzo de nuestro trabajo, utilizamos un método fotométrico sin control de temperatura y sin automatización de la gráfica. Los datos obtenidos en 100 individuos estudiados no los hemos hecho constar pues difícilmente serían valorables junto a los estudiados por el agregómetro suministrado por el Prof. Born (7, 8).

La valoración de la agregación, para todos los autores es un problema. Nosotros hemos utilizado un método nuevo sugerido por el Prof. J. Riverola. Hemos considerado a priori una relación lineal entre densidad óptica y agregación plaquetaria. Con este supuesto hemos valorado las curvas de agregación, por el método con que se valora una curva logística. Obtuvimos cinco parámetros, de los cuales creemos son valorables tres; máximo de agregación, velocidad de agregación y una interrelación de ambas que además nos sirve de control.

Dado que, el objeto de nuestro estudio era ver si existía o no hiperagregación plaquetaria hemos utilizado concentraciones de ADP muy bajas de 1,25 y 0,62 mM.

*Inhibidor «in vitro» de la agregación:* Como inhibidor «in vitro» hemos utilizado Dipiridamol en concentraciones de 0,5 mgs., a tenor de las de ADP. Rossuer, con esta cantidad de Dipiridamol pero con mayores concentraciones de ADP, no obtenía inhibición de la agregación.

Creemos que los inhibidores de la agregación son un campo a roturar con gran trascendencia clínica y terapéutica. El conseguir inhibidores selec-

tivos sobre la agregación, daría luz sobre su posible mecanismo; al no conocer éste se debe el que las hipótesis y pruebas efectuadas no tengan a veces suficiente expresividad clínica y los resultados sean contradictorios. El Dipiridamol haría que las adenosina desapareciera más tardíamente a nivel de sangre entera o PRP. Otros autores piensan que afectaría los niveles de AMP cíclico por inhibición de la fofodiesterasa.

Con el Prof. Castillo hicimos un estudio con individuos normales a los cuales se les inyectó 10 mgs. de Dipiridamol intramuscular, no obteniendo efectos significativos a las dos horas sobre los parámetros de agregación.

*Lípidos:* Los métodos utilizados han sido métodos químicos, electroforesis en acetato de celulosa y cromatografía en capa fina (9, 10, 11, 12, 13, 14). La determinación de lípidos totales nos parece un parámetro poco valorable. La cromatografía nos ha servido para control de las determinaciones químicas y esperamos sirva para posteriores estudios.

No hemos hecho valoración de lípidos-enfermedad, sino que los valores los hemos contrastado con las funciones plaquetarias asociado a su enfermedad fundamental o independientemente.

## RESULTADOS

La *adhesividad* por el método de Breddin se realizó en 111 individuos separados en cuatro grupos:

- Individuos normales: 32
- Enfermos con arterioesclerosis: 34
- Enfermos con diabetes: 36
- Mujeres tratadas con anticonceptivos: 9

El valor medio en adultos sanos que hemos obtenido es de 0,81 con una desviación standard de 0,09. Valores discretamente inferiores a los obtenidos por Breddin (1).

En enfermos con arterioesclerosis clínicamente manifiesta, la media resultó de 0,90 con una desviación standard de 0,17; aplicando el test de Student  $t = 2,62$  con  $p < 0,02$  estadísticamente significativo. En la literatura casi todos los autores encuentra aumento (15, 16, 17, 18) aunque Eisen y Etomorken (19) no han confirmado estos resultados.

En mujeres jóvenes tratadas con anticonceptivos la media fue de 0,99, con extracción realizada el día 14 del ciclo, con desviación standard de 0,17. Test de Student  $t = 3,86$  con  $p < 0,01$  muy significativo. La opinión en este sentido en la literatura no es unánime. (20, 21, 22).

En los enfermos diabéticos, la media obtenida fue de 0,84, con desviación standard de 0,19 y test de Student con  $t = 0,8$  no significativo. Hellen encuentra cifras de adhesividad alta en enfermos que requerían insulina; esta evidencia no ha sido confirmada por nosotros.

La *agregación* con el agregómetro de BORN y los parámetros lipídicos fueron estudiados en 129 individuos agrupados en la siguiente forma:

Individuos normales	52
Diabéticos con o sin arteriopatía clínica	17
Arterioesclerosis	25
Mujeres que tomaban anticonceptivos	19
Cor pulmonale crónico	6
Cáncer	5
Enfermedades infecciosas	4
Metaplasia mieloide	1

En cada uno de estos individuos se han realizado cuatro pruebas de agregación:

- Con una concentración de ADP de 1,25 mM.
- Con una concentración de ADP de 0,62 mM.
- Con una concentración de ADP de 1,25 mM, adicción e incubación con dipiridamol de 0,5 mgs.
- Con la concentración de ADP de 0,62 mM; adicción e incubación con dipiridamol 0,5 mgs.

Los valores normales obtenidos por análisis factorial fueron:

Máximo de agregación: 72,5.  
 Velocidad de agregación: 62,5.  
 Interrelación de ambas: 244,1.

Los datos de estos valores, en los enfermos los omitimos para no sobrecargar de datos este resumen.

*Correlación lípidos-agregación:* No pretendíamos hacer un estudio de la agregación en hiperlipemias, sino en los casos estudiados, hacer correlación enfermedad presuntamente trombótica-lípidos-agregación.

Diversos autores lo han estudiado dando valor a las sales sódicas de los ácidos grasos saturados de larga cadena, fosfolipídicos (23), lipoproteínas (24) y triglicéridos (25).

## CONCLUSIONES

I. — Hay una correlación de la adhesividad por el método de Breddin y agregación por el método de Born. Cuando aumenta la adhesividad aumenta la agregación.

II. — En los enfermos con arterioesclerosis aumentan la adhesividad y agregación; dentro de ésta más el máximo que la velocidad de agregación.

III. — En los diabéticos se modifican muy ligeramente los parámetros de la agregación y la adhesividad no aumenta significativamente.

IV. — En las mujeres jóvenes, que toman anticonceptivos aumenta la adhesividad muy significativamente; con respecto a la agregación aumenta la velocidad y más discretamente el máximo.

V. — En los enfermos con Cor Pulmonale crónico la agregación en sus dos parámetros está disminuida.

VI. — En los enfermos infecciosos y con carcinomas estudiados no hay variaciones significativas.

VII. — El intento de sensibilizar la técnica de BORN, mediante adicción e incubación con Dipiridamol «in vitro» para la demostración de estados de hiperagregación nos demostró:

VII a. — El dipiridamol a dosis de 0,5 mgs./ml. inhibe la agregación de manera constante a las concentraciones de ADP usadas.

VII b. — Esta inhibición, no es sin embargo, diferencial con respecto a plaquetas normales y plaquetas de individuos con las diferentes enfermedades.

VII c. — No hay interacción con el ADP significativa.

VIII. — El estudio de correlación enfermedad-lípidos-agregación de muestra que el aumento o disminución de los parámetros no es solamente achacable a los lípidos —cosa por lo demás clara.

La interacción lípidos-agregación demuestra:

VIII a.— Los lípidos totales apenas modifican los parámetros.

VIII b. — Las Beta lipoproteínas aumentadas provocan un discreto aumento de los parámetros de la agregación.

VIII c. — Los aumentos de colessterina provocan aumentos de la agregación máxima y de la velocidad de agregación.

VIII d. — Los aumentos de triglicéridos provocan disminuciones tanto del valor máximo de agregación como de la velocidad.

La Tesis consta de 209 páginas, 21 gráficas, 57 páginas dedicadas a valoración por análisis factorial y 140 citas bibliográficas.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. BREDDIN, K.: Experimental and clinical investigations on the adhesion and aggregation of human platelets. *Exp. Biol. Med.* 3,14 1968.
2. WRIGHT, H. T.: Tre sources of blood platelets and their adhesiveness in experimental thrombocytosis. *J. Path. Bact.* X.151-159-1944.
3. BORCHGREVINK, C. F.: A metotod for measuring platelet adhesiveness in vivo. *Acta med. Scand.* 168, 157. 1960.
4. GARCIA SAN MIGUEL: Tesis doctoral. Barcelona, 1971.
5. CAEN, J., JOSSO, F., SULTAN, Y., MEUDER, D. ALLAIN, J. P.: L'hémotase: L'expansion, 1970.
6. CAEN, J.: Platelet aggregation. Ed. Masson, 1971.
7. BORN, C.V.R.: Agregation of blood platelets by ADP and its reversal *Nature.* 194, 927. 1962.
8. BORN, G. V. R.: Quantitative investigations into aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 162, 67. 1962.
9. COROMINAS VILARDELL, A.: Contribución al estudio bioquímico de los lípidos. *Lipidurias*, 1969. Institut d'estudis Catalans. Arxius de la secció de ciencies. XLIII. 1970.
10. COROMINAS VILARDELL, A.: Aplicación de las técnicas cromatográficas al estudio bioquímico de los lípidos. 1970.
11. COROMINAS VILARDELL, A.: Lipobioquímica. Aplicación clínica: Apuntes de los cursillos realizados en el laboratorio Central de Bioquímica en noviembre de 1970 (I) y en junio de 1971 (II).
12. COROMINAS VILARDELL, A.: Lipobioquímica comparada. Estudio de lípidos y lipoproteínas en diversas especies animales. *Anales de Medicina y Cirugía.* 228-1972.
13. PASCUAL, C. y COROMINAS, A.: Glicéridos de suero. I. Métodos de valoración. *Anales de Medicina y Cirugía.* 221, 369. 1970.
14. PASCUAL, C. y COROMINAS, A.: Glicéridos de suero. II. Estudio de valores normales por el método enzimático de Eggstein. *Rev. Clin. Esp.* 1971.
15. BSBOUX, J. M., POMETTA, D., SCHERRER, J. R., ROSNER, J. P. BOUVIER, C. A.: Etude des variations de l'adédivité plaquettaire au verre, des lipides, de l'acide urique et de la tolérance aux hydrates de carbone durant la premier mois de l'évolution de l'infarctus du myocarde. Vol. 3, n.º 3, *Coagulation*, 231. 1970.

16. SJOGREN, A., BOTTIGER, L. E., BIORK, G. WAHLBERG, F. and CARLSON, L. A.: Adenosine diphosphate-inducet platelet aggregation in acute myocardial infarstion. *Thromb. Diathes. haemorrh.* 21, 76. 1969.
17. MOOLTEN, S. E., JENNING, P. B. and SOLDEN, A.: Dietary fat and platelet adhesiveness in arterioesclerosis and diabetes. *Amer. J. Cardiol.* 11, 290 1963.
18. HORLICK, L.: Platelet adhesiveness in normal persons and subjects witch atherosclerosis. Effest of high fat meals and anticoagulants on the adhesive index. *Amer. J. Cardiol.* 8, 459.
19. STORMORKEN, H. LUND-RIISE, A., and RORVIT, T. O.: Platelets counting. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7, suppl. 84, 183. 1965.
20. CLAVO, A., y CARRASCOSA, M. A.: Efectos secundarios de los contraceptivos orales. *Rev. Med. Univ. Navarra* XI, 117-1, 1967.
21. GENNES, J. L.: Trombosis de la carotida interna derecha bajo tratamiento contraceptivo continuo por acetato de chormalidona en una mujer de 28 años. *La Press. Med.* 355-1, 1971.
22. ZUCK, T. F. y colaboradores: Platelet adhesiveness in syntomatic women taking oral contraceptives. *Trombos and Diath. Haem.* 1970.
23. KERR, J. W., MAC AULY, I., PIRRIE, R. y BRONTE, S. STEWART, B.: platelet agregation by phospholipidssand free fatty acids. *Lancet*, 1.1296, 1965.
24. FARBISZEWSKI, R., SKYZYDLEWSKI, Z., et WOROWSKI, K.: The effect of lipoprotein fractions on adhesiveness and agregation of blood platelet. *Throb. Diath. haemorrh.* 21,89. 1969.
25. WILNER, G. O., NOSSE, L. H. L. and LE ROY, S. C.: Activation of Hageman factor by collagen. *J. Clin. Invest.* 47,2608, 1968.



FACULTAD DE MEDICINA

CÁTEDRA DE PATOLOGÍA GENERAL  
Y PROPEDÉUTICA CLÍNICA

Profesor: Dr. A. BALCELLS GORINA



Prof.Dr.D. Alfonso Balcells Gorina, Catedrático de Patología General y Propedeutica Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

C E R T I F I C A:

Que la Tesis Doctoral de D. Miguel Ingelmo Morin, "Contribución al diagnóstico de la hiperfunción plaquetaria en Clínica", estará en condiciones de ser presentada en Septiembre de 1.972.

Barcelona, 25 de Abril de 1.972

Firmado  
Prof. A. Balcells

R. 174.694

CATEDRA DE PATOLOGIA GENERAL

SERVICIO DEL PROFESOR DR. D. ALFONSO BALCELLS GORTIA

La realización del trabajo ha tenido lugar en el Servicio Central de Hemoterapia (Departamento de Farmacología y Terapéutica) y en Laboratorio Central de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Barcelona.

CONTRIBUCION AL RECONOCIMIENTO DE LA HIPERFUNCION PLAQUETARIA EN CLINICA



Trabajo que para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, presenta:

MIGUEL INGELMO MOJIN.

## I N D I C E

### JUSTIFICACION DEL TRABAJO Y AGRADECIMIENTO.

#### TEORIA.

##### I.- FISIOLOGIA PLAQUETARIA.

1. Historia.
2. Origen.
3. Regulación de la trombopoyesis.
4. Supervivencia plaquetaria.

##### II.- LAS PLAQUETAS: CARACTERES MORFOLOGICOS Y BIOQUIMICOS.

1. Número.
2. Estudio morfológico.
3. Estudio bioquímico.
4. Factores de coagulación plaquetarios.
5. Lípidos plaquetarios.
6. AMP cíclico.
7. Prostaglandinas.

##### III.- FUNCIONES PLAQUETARIAS.

##### IV.- INTERRELACION PLAQUETAS-VASOS.

##### V.- FUNCIONES PLAQUETARIAS EN CLINICA.

1. Adhesividad.
2. Agregación.
3. Agregación con ADP.

4. Inhibidoras de la agregación.
5. Electroforesis plaquetaria.
6. Factor 3.
7. Factor 4.

#### VI.- FISIOPATOLOGIA PLAQUETARIA.

1. Plaquetas y trombosis.
2. Plaquetas y arterioesclerosis.
3. Plaquetas y diabetes.
4. Anovulatorios.
5. Hipercoagulabilidad.

#### VII.-LIPIDOS.

1. Propiedades fisicoquímicas.
2. Análisis de lípidos.
3. Metabolismo de los lípidos.
  - 3.1. Lípidos.
  - 3.2. Ácidos grasos.
  - 3.3. Lipoproteínas.

#### PARTE EXPERIMENTAL.

##### I.- MÉTODOS Y TÉCNICAS.

1. Adhesividad plaquetaria.
2. Agregación plaquetaria.
3. Determinación de lípidos.
  - 3.1. Lípidos totales.
  - 3.2. Colesterol.
  - 3.3. Fosfolípidos.
  - 3.4. Glicéridos.
  - 3.5. Lipoproteínas.
  - 3.6. Cromatografía.

##### II.- RESULTADOS.

1. Cuadro global.
2. Análisis factorial.

3. Enfermedades. Agregación.
4. Factores aislados.
5. Interacción lípidos-agregación.
6. Interacción agregación-adhesividad.
7. Valores interacción del dipiridamol con los restantes factores.

### III.--DISCUSION.

### IV.-- RESUMEN Y CONCLUSIONES.

### BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

Desde mi época de estudiante me llamó la atención el gran número de enfermedades vasculares en las que la profilaxis era casi nula y el permanecer inermes ante su complicación más frecuente, las trombosis, casi una norma.

Movidos por este hecho clínico y dada mi vocación, heredada, de clínico semiólogo, comenzamos trabajos en Salamanca y más tarde en Barcelona, dirigidos por nuestro maestro el Profesor Balcells Gorina en el sentido de profundizar en la semiología de este campo.

Creo que se han hecho buenos estudios en este campo, pero fragmentados por la especialización de cada uno de los autores con relativo aislamiento y lo que faltan son las interrelaciones "in vitro" e "in vivo".

En nuestros balbuceos, técnicamente fuimos dirigidos por el Dr. A. Elos González.

Más tarde el Profesor R. Castillo Cofiño, con gran experiencia en este campo, centró nuestras ideas y nos resolvió los no pocos problemas técnicos que surgieron.

Nuestro aprecio y reconocimiento al Dr. A. Corominas Vilardell con el cual hemos hecho los estudios de lípidos que hemos contrastado con las pruebas funcionales plaquetarias, y el que siempre ha sido un acicate para su fin.

Agradecer su eficacia y constante colaboración a las Srtas. Montserrat Viñas y Juan M<sup>o</sup> Palomés Galeote, con las que hemos trabajado codo con codo.

A los clínicos que han estado al lado de los enfermos, compañeros en nuestra labor y a los internos que nos han ayudado en la recogida de datos, nuestro agradecimiento.

Al Dr. J. Riverola, Profesor del I.E.S.E. Dr. en Estadística, reconocerle su gran espíritu universitario, el cariño con que acogió el trabajo y sus muchas horas de dedicación.

A Marisa, mi esposa y fiel colaboradora, y a mis hijas la ayuda en todos

los campos, sin la cual no habría sido posible el final de este trabajo.

Este tema, hoy tan debatido, tiene múltiples veredas por donde caminar. Mi mentalidad de clínico, ha querido, cristalizar en algo utilizable y práctico toda una Fisiopatología plaquetaria nueva. Soy consciente de que es un grano de arena en el gran montón de publicaciones actuales sobre este tema. Hay conclusiones definitivas y otras que se han de someter a ulteriores revisiones; esperamos que nuestra aportación en el montaje de estas técnicas y su valoración sean útiles en la Clínica cada vez más.

## FISIOLOGIA PLAQUETARIA

### A) HISTORIA.-

A principios del siglo XIX, fueron muchos los investigadores que observaron las plaquetas. Donnó (1842) les da el nombre de "globulinas" y Zimmerman (1847) las describe y las llama "Elementarbläschen". Son confundidas con fragmentos eritrocíticos ó leucocíticos por Schultze (1865) y Reiss (1872). Osler (1874) reconoce su autonomía y las proclama "el tercer elemento de la sangre".

La descripción de trombosis experimental in vivo, más temprana fue hecha por Jones Hargen en 1878, reconoció por primera vez la participación de las plaquetas en la coagulación de la sangre.

Schimmelbresch, fue el primero en reconocer el cambio morfológico de las plaquetas en contacto con superficies extrañas, este autor y Eberth describieron los cambios morfológicos y físicos de las plaquetas adheridas, También describieron la metamorfosis viscosa. Los conceptos modernos han sido descritos por Lüscher (1967).

El papel de las plaquetas en la hemostasia no fue bien demostrado hasta principios del siglo XX.

Fue Bizzozero (1882) el que describió las plaquetas en los vasos mesentéricos del conejo y cobayo, su cualidad de la adhesividad y creó el término de "piastrine" el cual se usa generalmente en todas las lenguas. En 1901, Dekhyzen, les llama "trombocitos" creyendo erróneamente que eran células nucleadas.

En 1906, J.H. Wright, estudia el origen plaquetario.

Un gran investigador en este campo fue Tocantis (1901-1963).

Una gran cantidad de estudiosos en este campo se podrían citar, Wolpers y Rika en 1939 usaron por primera vez el microscopio electrónico y Jacques (1946) con la aplicación de la silicona hicieron progresar en la separación estos trabajos.

Hirsch, con la primera transfusión plaquetaria y la inmunohematología en 19 (Evans y Hawington) fueron dos nuevos campos de estudio.

En los últimos años, autores como Borg, Hellen, Sagnan, Mustard, Steiner, Marcus, Holmsem, Zicker, Weiss, White, Inceman, Karpathin, Caen, O'Brien, Ebbe

una legión más, están abriendo caminos nuevos en los mecanismos e implicaciones de las plaquetas en diversas enfermedades.

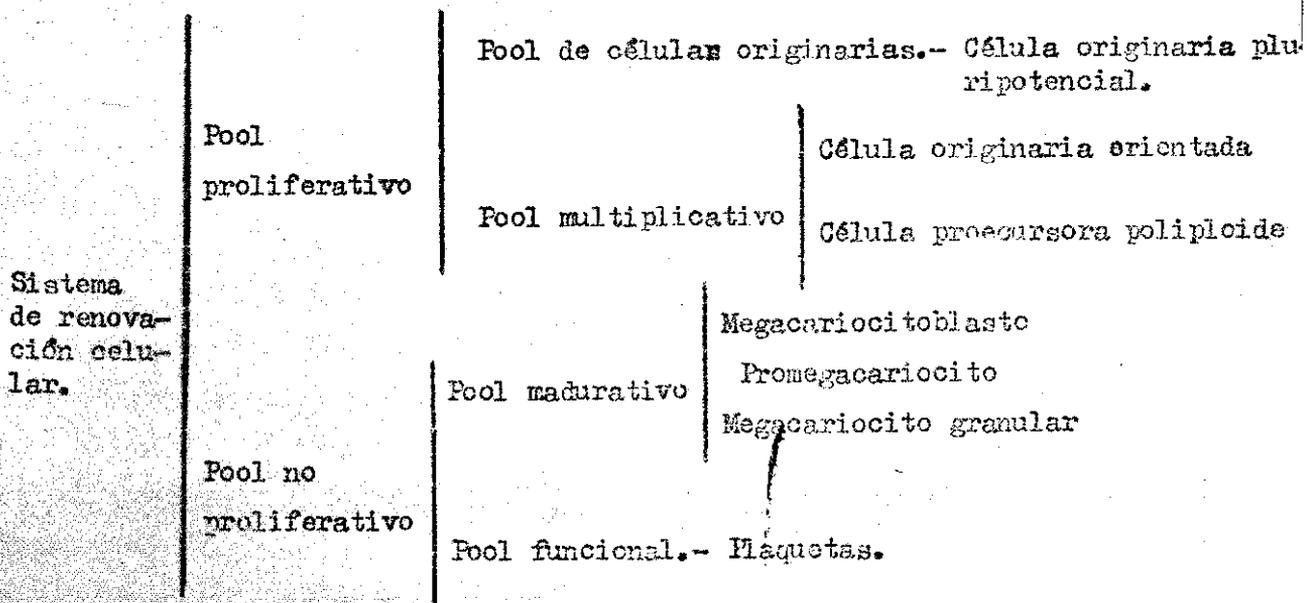
B) ORIGEN.--

Wright en 1910 afirma el origen de las plaquetas a partir de los megacariocitos. La microcinematografía (2), los métodos inmunológicos (3) y las reacciones citoquímicas, han probado esta asertación.

Kinosita y cols. han observado directamente la liberación de plaquetas a partir de los megacariocitos en ventanas practicadas en tibias de conejo (4). La localización de los megacariocitos es normal en la médula ósea y en el pulmón (5) y en estos lugares hay producción de plaquetas. Howell y Donahue han demostrado el recuento plaquetario es mayor en sangre arterial que en sangre venosa; en la médula ósea hay menor número de plaquetas que en el bazo y pulmón y por perfusión de la médula ósea se obtienen pocas plaquetas, sin embargo perfundiendo los pulmones se obtiene gran cantidad. Los megacariocitos observados en los pulmones desprendían activamente plaquetas (5). Se estima que del siete al diez % de las plaquetas se forman en los pulmones. En el bazo solo en determinadas condiciones patológicas, puede reaparecer la megacariocitogénesis, que es normal en el embrión.

Bien comprobado es origen plaquetario, veamos que se sabe sobre el camino y regulación de la formación de plaquetas. Se distinguen tres poblaciones en la megacariocitogénesis; población terminal pluripotencial prematopoyética, población germinal de células orientadas hacia una línea determinada y población germinal oligopotencial.

Modelo de Megacariocitogénesis (según EBBE) (6).



No se conoce el factor que ordena a los precursores megacarioblásticos, suspender la replicación sucesiva de DNA del compartimento germinal intermedio o Pool multiplicativo. En el Pool multiplicativo, la población celular tendría una síntesis activa de DNA. Dos tipos de división celular se conocen, sin saber el predominio de uno u otro o si se realizan alternativamente: mitosis normal y endomitosis. Para la endomitosis se han dado dos esquemas de interpretación, en el primero la maduración de núcleo y citoplasmas sería paralela y en el otro, la maduración del citoplasma comenzaría a partir del estadio 8n cromosomas, sin que hubiera paralelismo en la maduración núcleo-citoplasmática. De hecho parece que estos dos mecanismos están intrincados.

El tiempo de paso entre el pool madurativo y el funcional, para el hombre sería de 10 días, pero la duración de los estadios intermedios, no se conoce. Ebbe en las ratas (7), por autoradiografía, estableció los siguientes tiempos para el pool madurativo: a) megacarioblasto: 8-14 horas (18%), b) promegacariocito: 11-19 horas (25%) y megacariocito granular: 24-42 horas (57%).

Los megacariocitos salen a la circulación y por técnicas de leucoconcentración son encontrados normalmente en sangre periférica en cifras que oscilan entre 4 y  $12/\text{mm}^3$ . Dentro de los vasos están situados cercanos a los senos venosos y aparte de la médula ósea, se encuentran normalmente, como antes decíamos, en el pulmón (8).

La mayoría de las plaquetas, se forman a partir de los megacariocitos granulocitos en la médula ósea. Según Japa, el megacariocito se desarrolla por división mitótica normal, sin división citoplasmática. Las plaquetas podrían formarse a partir de megacariocitos, 8, 16 o  $32n$ , pero la mayor parte provienen de los  $16n$ . Es probable que el megacariocito  $32n$  produzca dos veces más plaquetas que el  $16n$ , pero esto no ha sido demostrado hasta el momento.

El proceso de formación se realiza, parece, por las controvertidas "membranas de demarcación". Estas membranas de demarcación, para unos autores provendrían de las vesículas de zona media, que al estirarse las formarían y por tanto serían intracitoplasmáticas. Para Behnke y otros autores estas membranas corresponderían a invaginaciones de la membrana del megacariocito y por tanto la membrana plaquetaria sería parte de la del megacariocito (9).

Parece que la última fase de salida de las plaquetas es "explosiva" y rápida, dando lugar cada megacariocito de 3.000 a 4.000 plaquetas.

c) REGULACION DE LA TROMBOPOYESIS. - (Economía plaquetaria periférica)  
Según EBBE (6).

Megacariocito granular

Número de plaquetas/día varía desde 20.000/mm<sup>3</sup> día/80.000 mm<sup>3</sup> día (Ebbe 76).

P. libres  
 Bazo ----- Circulantes  
 Pool -----

P. libres  
 Circulantes ----- Endo-telio vascular  
 Plaquetas ----- Tapones plaquetarios

14 días  
 Sistema RE  
 Agregados (ADP, Trombina, Tromboplastina)  
 Particulate matter

Compartimento	Plaquetas	Plaquetas
Células originarias pluri-potenciales.	Síndromes mieloproliferativos.	Anemia aplástica.
Células originarias pluri-potenciales. Precursores poliploides.	¿Trombocitosis no específica?	Amegacariocitosis congénita.
Megacariocitos reconocibles.	-----	Síndrome de Aldrich. Deficiencia de factor plaquetario.
Plaquetas.	Postesplenectomía.	Trombocitosis (inmune-mecánica) Esplenomegalia.

Es imposible, en el momento actual, establecer un modelo de la plaquetopoyesis, pero hay unas series de datos experimentales a reseñar:

1.- Después de sangrías repetidas, seguidas de reinyección de sangre desplaquetizada, una trombopenia severa aparece y no cura hasta 2-3 días después del cese de sangría, con lo que se sugiere la ausencia de reservas plaquetarias.

2.- La transfusión de plaquetas, representando varias veces el pool p. normal produce una caída transitoria de la cifra de plaquetas. Odell ha demostrado que el aumento de plaquetas circulantes inhibiría la diferenciación megacariocitaria.

en un estadio inicial (10).

El número constante de plaquetas sugiere por este segundo dato experimental la idea de un servomecanismo periferia-módula ósea, dependiente del número de plaquetas.

Schullman (11), ha mostrado en una observación que parece única, el aumento máximo de plaquetas después de 9-11 horas en un sujeto trombopénico, después de la transfusión de plasma fresco humano normal. Este enfermo sigue requiriendo transfusiones de plasma desde hace 10 años y su respuesta sigue igual. Esta observación prueba que una trombopenia puede ser debida a un déficit de un factor trombopoyético plasmático en el plasma normal. La regulación de la función plaquetaria por un factor humoral (trombopoyetina) es muy posible pero no hay pruebas de su existencia ni del lugar de acción de este supuesto factor. Wintrobe (12) cree se trata de una que contiene carbohidratos, se desplaza como una globulina alfa<sub>2</sub>, no es dializable y es termoestable.

#### D) SUPERVIVENCIA PLAQUETARIA.-

El estudio de la supervivencia plaquetaria es difícil dada la fragilidad de estos elementos. El marcaje con isótopos radioactivos, in vivo, in vitro, en plaquetas de seres humanos normales, dá unas cifras de estancia en la circulación de 7-14 días.

Se han discutido dos mecanismos de muerte plaquetaria:

- a) Por senescencia.
- b) Por destrucción al azar.

Estos dos mecanismos, en población homogénea plaquetaria, darían una supervivencia que teóricamente podría ser representada en dos tipos de curvas, para la muerte por senescencia la curva representaría un sigmoide con una meseta inicial de maduración; para la destrucción al azar la curva sería exponencial. Afectaría al 10-20% de plaquetas en juego.

Parece que la supervivencia total para Davey y otros autores, es la suma de los dos componentes lineal y exponencial.

La destrucción se haría principalmente en hígado y bazo. Ciertos autores han sugerido el papel importante del pulmón. El lugar de destrucción parece una guía fiel para la indicación de esplenectomía.

Comey y cols. (1968) apoyan el concepto de curva lineal de envejecimiento. Estudios en animales demuestran que plaquetas viejas son secuestradas por el bazo, pero estudios recientes confieren un importante papel al hígado (Schullman 1964) Majean (1967) estudió la senescencia plaquetaria en diversas enfermedades y vió

que era diferente y en enfermos con P.T.I. la destrucción de plaquetas marcadas era menor en jóvenes y aquellos que respondían a terapéutica específica.

De Gabriele y Penington (1967) demostraron un pool esplénico plaquetario. Ruzenberg y Firkin (1966) creen que este pool plaquetario esplénico está en equilibrio dinámico con las plaquetas circulantes.

El estudio de la supervivencia plaquetaria en clínica hasta ahora, es útil en las trombopatías permitiendo el mecanismo de aplasia, hiperesplenismo e hiperdestrucción periférica. Una duda que queda es si en algunos casos de trombosis no habría una disminución de la destrucción.

## LAS PLAQUETAS

1.- Número.-- La numeración de plaquetas en sangre total, no es todavía satisfactoria y solo la numeración en plasma rico en plaquetas, dá buenos resultados.

Los valores normales oscilan entre 150.000 y 300.000/mm<sup>3</sup>.

El ejercicio violento, los traumatismos, la inyección de adrenalina aumentan la cifra de plaquetas. También el traslado a grandes alturas.

Por lo general, los errores tienden a dar recuentos bajos, los recuentos plaquetarios realizados por métodos indirectos, tienden a ser más elevados que los que se obtienen por los métodos directos.

En el primer día de la menstruación, se producen descensos de 50-75%, en el tercer ó cuarto día vuelven a aumentar (12). Pohle observó una disminución lenta y progresiva en los 14 días previos a la menstruación y un rápido aumento después de la iniciación de la regla. En el embarazo se han descrito ligeros descensos en el primer periodo del parto y en el primero y segundo día del periodo.

### Variaciones patológicas.

Fracturas óseas, sobre todo las de cuello y fémur; intervenciones quirúrgicas (desde el 30 al 100%) y máximo entre 7º y 20º día; hemorragias agudas; leucemia mielocítica crónica; policitemia vera; postesplenectomía; Hodgkin; Artritis reumatoidea; colagenosis; sarcoidosis, colitis selarosa y enfermedad de Crohn; trombosis de vena esplénica y neoplasias (40% de los casos).

Con respecto al turnover diario plaquetario, los estudios con isótopos radia-ctivos, han dado resultados diferentes, Así Cohen usandó el Cr<sup>51</sup>, estimó la producción diaria con más de 80.000/mm<sup>3</sup>, mientras que Davey utilizando el mismo isótopo, sugirió 40.000/mm<sup>3</sup> día.

Karpaktin en 1968 (14) separó del extracto de plaquetas humanas, dos poblaciones con densidad extrema, por centrifugación. Unas grandes con una gravedad específica mayor de 1.055 y una población pequeña con gravedad específica menor de 1.046 que representan aproximadamente, el 15-20% del volumen total.

El promedio de volumen de las grandes, es de 12 micras<sup>3</sup> y el de las pequeñas 5 micras<sup>3</sup>. Las plaquetas grandes contienen más glucógeno de una a tres veces más ATP y la glucoginólisis síntesis proteica y síntesis de glucógeno, son aproximadamente 4 veces mayor. No hay diferencias significativas con respecto

a lípidos totales ó síntesis total de lípidos. Con estudios con isótopos en plaquetas de conejos, se ha demostrado que las grandes corresponden a las plaquetas jóvenes y el progreso en la edad disminuye el volumen y el potencial metabólico. Las plaquetas grandes tienen menor superficie por unidad de volumen, más AIN utilizable por área de superficie para la actividad ATP-asa en membrana y esto les hace ventaja para la agregación plaquetaria y liberación de ATP después de estimulada la formación de tapón hemostático. Se ha comprobado que hay un aumento de grandes plaquetas en situaciones de trombocitosis, pérdida sanguínea en pacientes con anticuerpos antiplaquetarios circulantes, con la edad en ratas y en hemorragias agudas en perros. Estos datos han de ser tomados con precaución, no obstante en una situación clínica con trombocitosis aumentada y por tanto aumento del índice de plaquetas grandes, puede dar resultados que reflejen este aumento relativo, antes ó mejor, que una anomalía inherente refleje de esta situación particular clínica.

2) Estudio morfológico.- Los estudios con microscopio de luz convencional, solo aportaron el tamaño y la delimitación de granulómero e hialómero. Han sido los estudios con microscopios electrónicos, usando soportes finos con resina de poliéster, que se puedan estudiar secciones de 500 Å las que han dado luz sobre la ultraestructura plaquetaria. El aspecto global de las plaquetas, varía con el método de preparación.

1.- Membrana celular: Forjada por tres capas, dos capas de 20 Å cada una, densa electrónicamente, separadas por una capa menos densa. La anchura total de 70-90 Å. Tienen estas membranas una doble capa de lípidos y fosfolípidos, cubierta a los dos lados por una capa de proteína.

Machman y Marcus sospecharon que esta membrana juega un papel central como catalizador de superficie mediante en los procesos complejos bioquímicos de la hemostasia.

2.- Membrana plaquetaria: Capa granular fina de menos de 500 Å de anchura, que envuelve la membrana celular, que corresponde a la "atmósfera periplaquetaria" de Roskan descrita en 1922.

Marcus y Zucker (1965) creen que es parte íntima de la membrana celular, pero Schoulz y Langaber (1966) creen que son proteínas plasmáticas absorbidas. Esta zona es muy rica en factores de coagulación: V, VIII y XII y fibrinógeno. (14)

3.- Mitocondrias; ó beta gránulos: son redondos u ovales, variando su tamaño de 1 a 0-3 micras de diámetro y están envueltas por una membrana doble. Son diferentes de las mitocondrias de otras células por su menor número (de 1 a 6) y por notener inclusiones oscuras. Es el lugar principal de producción de energía mediada por el ATP. Las plaquetas relativamente contiene más ATP que las demás células de nuestro organismo. Contribuyen mucho en las funciones de retracción del coágulo, adhesividad, agregación y fagocitosis.

4.- Los cuerpos densos ó alfa gránulos lisosomas: son los orgánulos más abundantes. Forman un grupo heterogéneo estructural y funcionalmente, teniendo en común una membrana doble ó triple de 70-80 Å de anchura. Se ha descrito que contienen serotonina, fibrinógeno, factor plaquetario 3. Siegel no acepta la idea de que los cuerpos densos sean iguales a los gránulos alfa, y dividen los gránulos plaquetarios en diferentes sub-fracciones diferenciando lisosomas de gránulos alfa (15).

La naturaleza exacta se desconoce. Parece ser almacenes de aminas y durante la agregación plaquetaria desaparecen; este proceso parece ser un proceso rápido y activo, teniendo implicaciones los microcanaliculos y vesículas.

En las plaquetas conservadas, la membrana se rompe y los enzimas son liberados.

La forma de las plaquetas decíamos, varía mucho con el método de preparación. Pe-

ro está en relación con el sistema microcanalicular plaquetario que deriva de la membrana citoplasmática, conectando con el exterior de la célula (16). Los componentes periplaquetarios, proteínas plasmáticas, circundan este sistema microcanalicular.

5.- Microtúbulos: Son inclusiones cercanas a la superficie plaquetaria, pero no en contacto con ella. Behrke y Zelander (9) por estudios en plaquetas humanas y de ratas vieron que los microtúbulos están formados por alrededor de 6 filamentos con subunidades paralelas en un plano longitudinal, cada una de anchura de 35 Å y pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la forma plaquetaria. Silver cree que pueden tener que ver con la formación de pseudópodos. Este sistema tubular, algunos autores los estudian como vacuolas y vesículas (14bis). Más recientemente se cree que los microtúbulos formarían parte de un sistema contractil asociado con la trombostenina.

Sixma y Molenaar han descrito microfibrillas, que tendrían que ver también con la forma plaquetaria, pero su existencia no está probada (16 bis).

6.- Los filamentos: han sido bien descritos en forma de bultos en toda la célula, bien alrededor de la circunferencia plaquetaria y extendiéndose en los pseudópodos.

7.- Inclusiones: separadas han sido descritas: similares a aparato de Golgi (presente en megacariocitos) siderosomas ó gránulos delta, ribosomas, gránulos de glucógeno e inclusiones lipídicas.

De los estudios morfológicos en los trastornos plaquetarios, los resultados son confusos.

## ESTUDIO BIOQUIMICO

Las plaquetas tienen una actividad respiratoria muy importante, con cociente respiratorio próximo a la unidad (17). Desprovistas de ácido desosiribonucleico, los glúcidos representan el 8,5% del peso seco, los lípidos el 15% y las proteínas el 60%. Aproximadamente el 15% proteico, corresponde a la trombostenina (18). Parece demostrado que las plaquetas pueden sintetizar proteínas tales como taurina, trombosfenina, etc. (19).

### PROTEINAS.-

1. Trombostenina: Es una proteína contractil relacionada con la actomiosina muscular, y es idéntica a ATP activada con iones cálcicos e iones magnésicos (20). Últimos trabajos propusieron la hipótesis de que la trombostenina era la responsable de la retracción del coágulo. La actividad contractil de la trombostenina, es dependiente del ATP.

La localización de la trombostenina en la plaqueta, ha sido descrita en varios puntos: microtúbulos, fibrillas y otros orgánulos. La actividad ATP-asa, ha sido descrita en la membrana plaquetaria por Salzman.

Bettex-Galland en 1969, describe dos componentes de la trombostenina: A y M, cree que en la plaqueta relajada esta proteína está distribuida en el citoplasma y preferentemente en zonas marginales.

Jones en 1966, relaciona la trombostenina con la agregación plaquetaria. Un mecanismo posible es que la agregación sea provocada por la formación de puentes de actomiosina entre las plaquetas (22). Booyse demostró la capacidad de producir trombostenina in vitro, en la superficie plaquetaria (23).

Una actividad ATP-asa, diferente de la trombostenina, ha sido descrita en las plaquetas (24).

2. Fibrinógeno: Tiene un peso molecular similar al plasmático y es idéntico inmunológicamente, pero se diferencia de éste en que es coagulable incompletamente. Ha sido descrito en la membrana plaquetaria e intracitoplasmática.

Diversos autores creen que el fibrinógeno tiene su función en las primeras etapas de la agregación. El estudio de la agregación en enfermos con trombostenina y afibrinogenia en que el fibrinógeno está disminuido, parece que apoya la hipótesis de Nachman, (14) que existen dos pools separados intra y extracelular.

3. Aminas: La serotonina es transportada casi exclusivamente por las plaquetas. La concentración de las plaquetas se obtiene por difusión pasiva, pero hay también un transporte activo (25). No hay evidencia de la producción de serotonina por la

plaqueta, pero sí en los megacariocitos (25). Se localiza en los gránulos alfa y es liberada por la acción de la trombina.

Se han demostrado en las superficies plaquetarias, receptores específicos para la serotonina. Born pensó que la agregación plaquetaria dependía de la combinación con estos receptores específicos. También hubo evidencia que "in vivo" la serotonina puede inhibir la agregación y se postuló que este mecanismo inhibitorio, puede ser una nueva forma de profilaxis de la enfermedad trombótica.

Adrenalina y noradrenalina también existen pero en cantidades menores que la serotonina.

Las proteínas contenidas en los gránulos plaquetarios se han separado por cromatografía en los últimos tiempos (22), demostrando en la piel de conejo, un aumento rápido de la permeabilidad vascular que no cedía con antistamínicos, sugiriendo la liberación de estas proteínas de los lisosomas de las plaquetas humanas, e incrementan la permeabilidad vascular. Esto jugaría un papel importante en las respuestas de los vasos a estímulos locales inflamatorios.

ENZIMAS DEL METABOLISMO PLAQUETARIO (Según J. CAHN) (18).

GLUCIDOS	LIPIDOS	PROTEINAS	NUCLEOTIDOS y ACIDOS NUCLEICOS
<b>CATABOLISMO</b>	<b>CATABOLISMO</b>	<b>CATABOLISMO</b>	<b>CATABOLISMO</b>
-Enzimas de la vía de Embden-Meyerhoff	-Lipasas -Hidrolasas (esterasas, fosfatasas)	-Oxidasa -Descarboxilasas -Deshidrogenasa	-Trombostenina y otras ATP-asa Mg++ ó Ca++ dependientes
-Enzimas del Shunt de las pentosas-fosfatos			
-Enzimas del ciclo de Krebs.		-Peptidasas -Kinasas -Transaminasas -Fibrinasas	-Adenil-S-Fosfatasa -AP y Rasa -Adenilato-Kinasa -Nucleotidasa
-Fosforilasa -Fructosa-fosfato-aldolasa y fructosa-6-fosfoquinasa.			
<b>ANABOLISMO</b>	<b>ANABOLISMO</b>	<b>ANABOLISMO</b>	<b>ANABOLISMO</b>
-Síntesis de Glicógeno	-Síntesis de Lípidos	-Síntesis de Tau-rina -Síntesis de Trombostenina.	

FACTORES DE COAGULACION PLAQUETARIOS

Dos tipos de factores han sido identifiados: unos absorbidos a la membrana plaquetaria y otros que forman parte intima de la estructura plaquetaria.

Factores de superficie.- Entre los factores adsorbidos a la membrana plaquetaria, se han descrito: fibrinogeno, factor II, V, VII, IX, X, XI y XII además del factor estabilizador de la fibrina. Dentro de ellos, hay algunos que son fácilmente despegables, como son la protrombina y los factores VII, IX, y XII, sin embargo, el fibrinogeno y los factores V, VIII y XI están fuertemente pegados.

Iatridis y Ferguson (26) demostraron la existencia de estos últimos factores en plaquetas lavadas repetidamente. La significación de estos factores y su papel en la hemostasia y coagulación no están aclarados.

Factores plaquetarios.- Se representan en números arábigos y están bien descritos cuatro factores.

Factor 1.- Acelera la activación de protrombina por extractos tisulares. Deutsch y Hjort demostraron que este factor era el factor V adsorbido. Sin embargo, es estable en contraste con el factor de la coagulación, cambio que parece producido durante la adsorción.

Factor 2.- Es una proteína y acelera la conversión de fibrinogeno a fibrina por la trombina.

Factor 3.- Es una lipoproteína con propiedades tromboplásticas. Es en 1950 cuando Jürgens y Deutsch (27) los separan de los factores de la coagulación. Está en forma no disponible en los gránulos del citoplasma y en la membrana plaquetaria (17). Es liberado en la formación del tapón hemostático. Wolf (28) demostró que el plasma libre de plaquetas, contiene un polvo plaquetario rico en fosfolípidos similares a los del factor 3.

Factor 4.- Es un factor intracelular con actividad neutralizante de la heparina. Ha sido obtenido purificado y se ha demostrado que es una proteína. Es liberado rápidamente durante la agregación y aumenta ésta producida por ADP. Es considerado por algunos como un agente agregante potente y específico in vivo. Su actividad se mide determinando su acción antiheparina y coagulante. Recientemente se ha visto que no está disponible igual que el factor 3 en las plaquetas intactas, pero es liberado en la agregación plaquetaria. (30).

También recientemente, se ha visto que plaquetas incubadas a 37° durante 16 a 20 horas, separadas y lavadas, forman un factor de actividad tisular. Parece que en un mecanismo vestigial de poca importancia, excepto en personas con un defecto intrínscico del mecanismo de coagulación (31).

## LÍPIDOS PLAQUETARIOS

Se pueden distinguir una fracción lipídica neutra y una fracción fosfolipídica. Los lípidos neutros comprenden los mono, di, y triglicéridos, el colesterol libre y esterificado. La fracción fosfolipídica, es específica plaquetaria y corresponde al factor 3. Está formada por fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, inositolfofátido, lecitina y esfingmielina (32).

Marcus en 1971, cree demostrado que el metabolismo lipídico plaquetario es muy activo. Los fosfoglicéridos, que importan el 77% de los lípidos totales, pueden ser sintetizados a partir del glicerol. La membrana plaquetaria es capaz por la lisolecitina, de hacer soluble en agua un proteato como la glicerofoforilcolina. La misma lisolecitina puede convertirse dentro de la plaqueta, en lecitina a razón de un 2% por hora, por la vía de Land ó por acetilación directa. La síntesis de ácidos grasos existe en las plaquetas y es un hecho el aumento después de la esplenectomía (33).

Alrededor del 0,5% del total de lípidos, son gangliósidos. Los gangliósidos y no otros lípidos, pueden ligar débiles cantidades de serotonina y reversiblemente.

No se han encontrado diferencias entre poblaciones plaquetarias, grandes y pequeñas con respecto a los lípidos totales ni a la síntesis (13).

Las inclusiones lipídicas que han sido reveladas por el microscopio electrónico, han sido consideradas como un signo de desórdenes plaquetarios cualitativos pero estas inclusiones pueden verse en plaquetas normales. El número de inclusiones lipídicas es normalmente máximo cuando la concentración de lípidos en sangre es alta. Schulz y Wedell han demostrado inclusiones lipídicas en sujetos a los que se les ha perfundido infusiones de lípidos (Lipofundin). Sugieren que las plaquetas fagocitan y transportan lípidos (14bis).

AMP Cíclico: Fue descubierta esta substancia termoestable por Sutherland y cols. en 1957. El papel de segundo mensajero en la acción de las hormonas, fue hallado por Sutherland y Rall en 1960. Estos mismos autores han mostrado que la concentración intracelular de AMP que es rápidamente variable, resulta de la acción de dos enzimas específicos, el uno sintetizando el nucleótido: ademiciclina y el otro hidrolizándolo: fosfodiesterasa. La adeniciclasa está estrechamente ligada a la membrana celular. Según recientes hallazgos, las plaquetas contienen tanta cantidad como el cerebro. Los estimulantes más corrientes de la adeniciclasa, son las hormonas. Catecolaminas y prostaglandinas, se ha demostrado que estimulan la adeniciclasa de las plaquetas.

El AMP provoca en las plaquetas "in vitro" las anomalías funcionales que caracterizan las plaquetas de la enfermedad de Glanzmann.

En 1965, Marcus y Zucker (37) ven que el AMP es un débil inhibidor de la agregación plaquetaria. Se ha reconocido recientemente que muchas substancias ejercen su función por efectos en el metabolismo de AMP. Ver table de Salzman (34).

TABLA. Influencia de los agentes que afectan a la agregación plaquetaria ó metabolismo cAMP.

AGENTE	AGREGACION	cAMP	ADENIL CICLASA	FOSFODIESTERASA PLAQUETAS PRP LISADAS
Epinefina	+			0
norepinefina				
alfa			(Epin)	
beta			0(0 Epin)	
5-HT	+			
trombina	+			0
ADP	+		0	0
colágeno	+			0
ácidos nicotínico				
kaolín	+			
centrifugación	+			
PGE <sub>2</sub>				
PGE <sub>1</sub>				0
cafeina				
teofilina				
papaverina				
dipiridamol				

R.J. Haslam y A. Taylor estudian los niveles de AMP cíclico en plaquetas, marcándolo con  $C^{14}$  adenina y encuentran que ADP, adrenalina y varofinamina, no producen variaciones sin embargo, la prostaglandina  $PGE_1$  produce unos valores muy bajos. (37).

Los efectos del AMP cíclico y su posible mecanismo de acción sobre la agregación plaquetaria son oscuros. Parece que un posible mecanismo sería la estimulación de la actividad protein-lipasa (Kvo, Greengard 1969). La reducción del AMP es máxima a los 10 segundos de aplicación del estimulante de la agregación (ADP, adrenalina, trombina, etc) (37bis).

#### PROSTAGLANDINAS Y NIVELES DE AMP CICLICO EN PLAQUETAS HUMANAS.

Fue Kloeze el que descubrió el efecto de las prostaglandinas en las plaquetas humanas y de animales de experimentación, pero solo recientemente se ha entrevistado el mecanismo por el que actúan.

Las prostaglandinas, inhiben la agregación plaquetaria en respuesta a una gran variedad de agentes. Cuatro líneas de evidencia parecen soportar el que el efecto de la prostaglandina es mediado por el AMP cíclico. (36).

1. Las prostaglandinas son potentes estimulantes de la adenilciclase plaquetaria.

2. Las prostaglandinas incrementan en plaquetas intactas, el "nivel" estable de AMP cíclico en estas células. La incorporación de radioactividad dentro del AMP cíclico refleja un incremento del cociente de síntesis del nucleótido cíclico en las células intactas.

3. El que el efecto sea potenciado por la teofilina que es un conocido inhibidor de la fosfodiesterasa.

4. El efecto puede ser reproducido por AMP cíclico exógeno, con el derivado de butiril, siendo más potente que el originario AMP.

#### FUNCIONES PLAQUETARIAS.

Intentaremos resumir las funciones plaquetarias y estudiaremos los aspectos de cada una de ellas, revisando los que más directamente nos atañen.

I.- Parada de la hemorragia.

II.- Formación de agregados para la construcción del clavo hemostático.

III.- Aceleran la generación de trombina y la formación de fibrina.

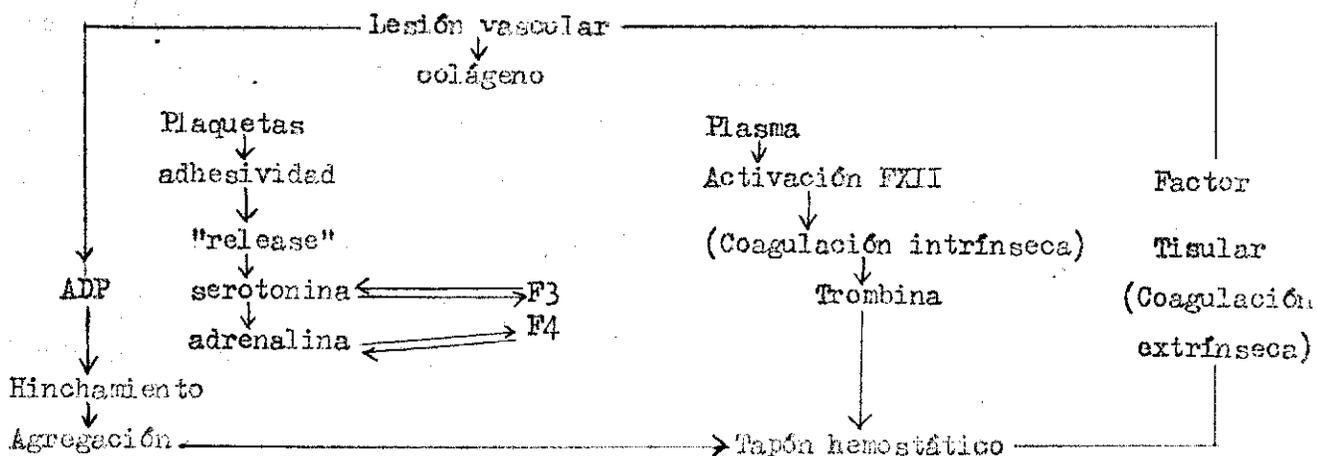
IV.- Son vehículo de aminas activas y producen su liberación ("release").

V.- Mantienen la integridad de los vasos.

En primer lugar ante una lesión en un vaso, se produce el fenómeno de la "hemostasia primaria", que es la sucesión de fenómenos para el paro de la hemorragia.

Clásicamente se describen una vasoconstricción cuyo mecanismo es mal conocido y después la secuencia de reacciones plaquetas-vasos, que son mejor conocidas.

Un esquema simple de la hemostasia, tomado de una revisión nuestra anterior, (B) (38) puede ser:



La adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno, está bien demostrado. Es rápida e irreversible. Según Caen la adhesión depende "in vitro" de la polimerización (bien conocido es el efecto de la glucosamina y urea) e "in vivo" por la maduración (cuanto más viejas son las plaquetas menos adhieren). (39). Parece que el mecanismo es un fenómeno electrostático al que sigue el "Swelling" ó hinchamiento plaquetario y la liberación de diversos componentes "release".

La agregación de las plaquetas reversible al comienzo y luego irreversible, da lugar a la formación del tapón hemostático. Parece que el ADP es la vía terminal común de esta agregación (32).

No parece que el fenómeno de adhesión sea igual "in vitro" que "in vivo". In vitro son necesarios cationes divalentes, fibrinógeno y un cofactor plasmático, hasta hoy desconocido, que falta en la enfermedad de Von Willebrand.

Rodman en la agregación diferencia cuatro etapas: "morfológicas":

Fase I.: Las plaquetas serían unidades singulares y los orgánulos intraplaquetarios emigrarían centralmente.

Fase II.: Las plaquetas aglutinan y forman especie de mosaico.

Fase III.: Las plaquetas se desmenuzan (trombocitopenia) desintegrándose los orgánulos en la membrana.

Fase IV.: Las plaquetas no son identificables.

En las fases III y IV, entraría en escena la fibrina.

La consolidación de la masa de plaquetas, es lo que se ha denominado metamorfosis viscosa. Para Lüscher (41) se pueden distinguir tres fases dentro de ellas:

1. Hinchamiento, degranulación y "release", 2. Contracción y compactación de agregados, en parte debido a trombostenina, 3. Deposición de fibrina en los agregados

Los cambios inducidos por ADP y trombina, estudiados por Booyes (42) usando una técnica de "luz-sombra", modificada por mica, han dado una serie esencial de acontecimientos: a. cambios en la permeabilidad de membrana plaquetaria debido a interferencias con ATP-asa de membrana, b. modificaciones del citogel plaquetario, rico en trombostenina, c. contracción rápida de citogel, dando lugar a agregación y "release".

LIBERACION O "RELEASE".

Usado el término por primera vez por Grette en 1962, estudiando el efecto bioquímico de la trombina ó de las plaquetas. Es un proceso muy específico, rápido con gran dependencia energética.

Con el término "release" se indica la liberación de nucleótidos del almacén contenido en los gránulos densos electrónicamente. Estos nucleótidos, no son parte del pool metabólico ni están en contacto con él. Aminas vasoactivas como la serotonina, son también liberadas por estos agentes tubulantes del release, parece haber diferencia entre estas reacciones.

Este "release" selectivo, es dependiente de cationes divalentes, especialmente calcio y de una fuente de energía. El mecanismo del release, comprende la contracción y descarga del sistema membranoso de canalículos internos. Las plaquetas para producir esta liberación han de adherirse a estos estímulos. La cubierta plasmática de la superficie plaquetaria se incluye en esta adherencia. Si la superficie plaquetaria está recubierta de albúmina, esta tiene tendencia a inhibir la adherencia cuando está cubierta por fibrinógeno y gammaglobulina, se potencia la adherencia, pero el fibrinógeno no causa peligro. Es decir, que la simple adherencia a la superficie, no es estímulo suficiente para causar el release (42).

Someramente vamos a ver algunas substancias capaces de provocar el release de algunas particularidades de ellas:(43,44)

a. Trombina: Causa la liberación de ADP, seronina, prealbúmina, albúmina, alfa y beta globulina, fibrinógeno, factores III y IV, catepsina, y mucopolisacáridos.

La naturaleza del sustrato de la superficie plaquetaria, con el que interactúa es desconocida.

b. Colágeno: Depende del calcio y fuente de energía. Plaquetas de conejo lavadas no producen "release" si no hay en el medio glucosa. El bloqueo de los grupos aminopeptideo de la lisina, inhiben la agregación con el colágeno. Quizá el colágeno tiene un efecto indirecto por su habilidad de activar factor XII. Las plaque-

tas jóvenes adhieren mejor que las viejas.

c. Gammaglobulina: Parece que el complemento tiene que ver en las reacciones de la gammaglobulina, Henson en estudios con plaquetas de conejo, concluye que ha tres diferentes mecanismos de reacción inmunológica: 1. reacción directa de complejos antígeno-anticuerpo con las plaquetas, 2. efecto de los neutrófilos al interactuar con los complejos antígenos-anticuerpos, 3. los leucocitos sensibilizados pueden ser estimulados, en ausencia de complemento, por antígeno y actuar sobre las placas.

d. Bacterias, virus y endotoxinas: La acción de las bacterias en presencia de gammaglobulina, conduce al "release". Las endotoxinas producen la liberación de plaquetas de conejo y perro, pero no se ha demostrado en plaquetas normales.

e. Epinefrina y serotonina: Parece que actúan por liberación de ADP.

f. ADP: Sería el responsable de la segunda curva de agregación que obtenemos in vitro, pero parece un artificio de este tipo de test "in vitro".

g. Ácidos grasos: Los ácidos grasos, está bien demostrado, que producen agregación plaquetaria y el mecanismo parece ser el "release" de ADP. Ha sido bien demostrado que el estearato y los ácidos grasos saturados, con cadena larga, producen el "release" de serotonina e histamina de plaquetas de conejos en plasma heparinizado, Los ácidos grasos poliinsaturados, no causan agregación excepto el linoleato.

Variaciones de la concentración de ácidos grasos y la influencia de la unión proteínas-ácidos grasos, pueden afectar los resultados. El calcio parece que es necesario en la inducción del "release".

Los ácidos grasos libres activan el factor XII y por esto algunos piensan en un efecto sobre la generación de trombina y no un efecto directo sobre las plaquetas. Sin embargo, los ácidos grasos libres, pueden agregar las plaquetas en presencia de concentraciones de heparina suficientes para inhibir la coagulación de la sangre. También las plaquetas lavadas, incluyendo las de pacientes con deficiencia de factor XII, son agregadas por ácidos grasos (44bis).

Recientemente se ha visto que emulsiones con gran proporción de ácidos grasos no esterificados, ó emulsiones de ácidos grasos puros, causan la destrucción de plaquetas.

Otros muchos agentes han sido descritos como productores de "release".

Weiss en 1971, estudia pacientes en los que el "release" plaquetario está alterado, encontrando en algunos déficit en el almacén de nucleótidos, y en una familia encontró fosfolípidos de ácidos grasos anormales. En otros pacientes se obtienen una semiología plaquetaria similar a la obtenida después de la ingestión de aspirinas y en otros, halla una deficiencia en serotonina (45).

Holmsen (44) y cols, ha sido arbitrariamente dividido en cuatro etapas la liberación de constituyentes plaquetarios:

1. Inducción: interacción del agente inductor y la membrana plaquetaria que provoca la iniciación del "release". Las plaquetas se vuelven "adherentes" y es posible que éstas puedan actuar como inductores de otras.

2. Transmisión intraplaquetaria: es el paso del estímulo de la membrana a las estructuras intraplaquetarias. El mecanismo es desconocido y parece que está influenciada por el AMP cíclico.

3. Activación del ATP asas produciendo la energía requerida para la liberación.

4. Liberación propiamente dicha, de sustancias específicas en el medio extracelular. Aquí tendría un papel importante la trombostenina.

En resumen, el contacto de la sangre con superficies extrañas ó la rotura vascular, dá lugar a la adhesión plaquetaria, "release" y agregación plaquetaria, que con la trombina producida por el mecanismo de coagulación intrínseca, dan lugar al tapón hemostático.

### Interrelación plaquetas y vasos.

La íntima de los vasos es la capa directamente interesada y dentro de ella la capa de mucopolisacáridos y vesículas vistas por microscopio electrónico. La composición química de esta cubierta endotelial puede variar con la composición del plasma. El endotelio reposa sobre la membrana basal; su cara externa presenta conexiones estrechas con las fibras de colágeno subyacente. Las relaciones membrana nasal y colágeno, no parecen ser solo anatómicas sino también químicas (46). La tendencia actual es a considerar la membrana basal compuesta por colágeno poco polimerizado.

La plaqueta, como ya veíamos, tiene también una cubierta de mucopolisacáridos ácidosulfatado.

La interacción plaquetas vasos, depende de las propiedades hemodinámicas y de las propiedades de superficie de las plaquetas e íntima vascular. La adhesión de las plaquetas, no se produce a nivel de las células endoteliales, sino a nivel de las estructuras subendoteliales, membrana basal y colágeno. Cuando el colágeno está más polimerizado, las plaquetas se adhieren más. El mecanismo íntimo de unión plaquetas colágeno, es desconocido. La unión es diferente de otras adhesiones pues aquí el contacto es más íntimo y no se requieren ni presencia de cationes bivalentes ni proteínas plasmáticas. Los mecanismos de adhesión son diferentes que los de agregación, aunque parece que el ADP entra en juego, no parece que sea necesariamente ni único en este proceso. Es independiente de la coagulación y no parecen intervenir actividades de los lisosomas porque aunque la prometazina estabiliza las membranas de éstos, el EDTA inhibidor de la fagocitosis, no tiene efecto en este proceso. Born (47) cree que los fenómenos de adhesión de la naturaleza de los cambios de superficie que producen fuerzas lo bastante intensas como para vencer la separación de las plaquetas por las fuerzas electrostáticas y de deslizamiento. Existe evidencia de una adhesión inicial vía "spikes" que haría la repulsión electrostática bivalente; sería iniciada por el ADP y dependiente de la temperatura. En una segunda vía la adhesión por fuentes moleculares, por ej. fibrinógeno plasmático ó glicoproteínas y también existe la evidencia que durante el "release" las plaquetas están tan cerca de la repulsión electrostática parece eliminada. Este mismo autor cree que la adhesión y la agregación pueden ser iniciadas por un mismo mecanismo, la histamina es conocida por su poder de separación de células intersticiales y que acelera reversiblemente la aparición

de agregados; esto puede ser debido a un aumento de la difusión de ADP ó a colisiones de las plaquetas con las membranas vasales.

El contacto plaquetas-colágeno, dá lugar al hinchamiento plaquetario ("Swelling") y al "release" por liberación antes mencionada.

Uno de los factores liberados es el ADP. La adición del factor Hageman activado, colágeno, juntamente con plaquetas y tromboplastina tisular, puede generar trombina.

Para Wilner (48), estas reacciones son muy específicas y dependen: la integración plaquetas colágeno de los grupos aminos de la lisina, mientras que la activación del factor Hageman, depende de los grupos carboxilos de los ácidos glutámicos y aspártico de la molécula de colágeno.

La adhesión es favorable en principio.

Algunos autores hablan de las plaquetas como células nutricias del endotelio del vaso. Los conceptos de que las plaquetas tapen pequeñas aberturas en el endotelio y que haya intercambios con las células endoteliales no es tan claro.

En experimentación en conejos, no hay adhesión con una dieta normal pero sí con dietas ricas en colesterol, esto muestra como cambios plasmáticos varían estas relaciones plaquetas vasos. Se ha estudiado la capacidad de fagocitosis de las plaquetas frente a partículas de latex, en las que hay grandes alteraciones morfológicas, con lípidos en las que hay pocas alteraciones morfológicas, partículas de latex y gammaglobulinas que aumenta la adhesión y vidrio en gammaglobulina que igualmente la aumenta. El vidrio con albúmina no tiene efecto pero sí el fibrinógeno. Las diferencias en los grasos de adsorción de esta superficie, parece que dá el grado de integración plaquetaria con ellas. En la enfermedad de Willebrand, habría una falta de factor plasmático que cubre normalmente las plaquetas que impediría la adhesión (49).

Se sabe que en los vasos sanos los virus, los complejos antígeno-anticuerpo y otras substancias, pueden provocar las mismas modificaciones sobre las plaquetas, dando lugar a adhesión y a agregación igual que con colágeno.

## SEMILOGIA PLAQUETARIA

Muchos tests han sido utilizados para estudiar las funciones plaquetarias en animales, hombres sanos y enfermos. La falta de uniformidad en los términos empleados, ha creado confusión. Casi todos los test utilizan las propiedades básicas de adhesividad-agregación, aparte de la valoración de factores, electroforesis e inmunología.

### Adhesividad plaquetaria.

Concepto creado por Braunsteiner y Wright. Con este término se designa la propiedad de las plaquetas para pegarse a objetos extraños. por ej. vidrio.

Podemos medir la adhesividad in vitro e in vivo.

In vitro, la adhesividad depende de la habilidad de las plaquetas a pegarse a superficies de vidrio y a sí mismas; esto último señala que las pruebas de adhesividad no miden solo esta propiedad sino también la agregación. Se puede estudiar en sangre entera, PRP ó en suspensiones plaquetarias, exponiéndolas a un área standard de superficie de vidrio durante un tiempo dado, y efectuando contacto antes y después es del vaso por esta superficie. El descenso en el número de plaquetas ó la medida directa de esta número, nos da el grado de adhesividad. El método de Wright del bulbo rotatorio y el de columnas con bolas de vidrio de Hellem, han sido muy usados. Modificaciones de estos métodos y otros utilizando el mismo concepto han sido descritos con gran propulsión. (51). Todos estos métodos exigen la necesidad de tener una columna muy bien standarizada y muy preciso el tiempo de contacto; además depende de la cuenta exacta plaquetaria, dando lugar a errores. El material ha de ser desechado de una medida a otra.

Nosotros hemos utilizado el método de Preedding (52).

La técnica in vivo, fue inducida por Borgrewinck y mide la diferencia en los contajes plaquetarios en sangre obtenida de una herida en el antebrazo y venosa, simultáneamente. Nosotros la hemos utilizado con las modificaciones hechas por García San Miguel. (54). Con este método se mide el consumo de plaquetas causado por adhesividad y agregación.

### Agregación plaquetaria.

Es la propiedad de las plaquetas de unirse entre sí y formar agrégados. Los cambios de densidad óptica del PRP son medidos como agrégados plaquetarios ó plaquetas dispersas. Como método necesita la preparación de PRP con la posibilidad de recoger una población selectiva de plaquetas (55). Muchos autores han dudado de la validez de este método, no obstante creo que bien usado dá una idea sobre las

propiedades quinéticas plaquetarias. El control de la temperatura y la automatización de la gráfica, son dos importantes jalones en el perfeccionamiento de esta técnica.

El método fue introducido por Born (56,57) y por O'Brien (58) y ligeras modificaciones por Guthportson y Mills que introducen la automatización de la gráfica. Muchos test han sido usados, citaremos el de Born, Breddin, Eastham, partículas de latex, etc.

#### Agregación con ADP.

En 1960 Hallem describe un factor termoestable en los hematíes que "dispara" la adhesividad agregación plaquetaria. Un año más tarde identifica por cromatografía desenzimática, que el factor R es el ADP. Se obtienen de los hematíes 22 nucleótidos, pero solo dos, el ADP y el difosfato de dioxiadenosina, fueron activos.

Mac Millan (60) en 1966, usando el método de Born, describe dos fases de la agregación plaquetaria, una fase en todos los FRP probados y dos solo en algunos. La segunda fase, ocurrió con concentraciones de ADP de  $2,5 \times 10^{-7}$  M a  $8 \times 10^{-6}$  M con variaciones individuales plasmáticas. La primera fase se considera el resultado directo de la unión de las plaquetas al ADP y la segunda la liberación del ADP intraplaquetario.

Se han visto modificaciones de la agregación, por la concentración de ADP, temperatura, volumen de mezcla, concentración de calcio y otros factores plasmáticos, el papel que estos factores plasmáticos juegan en la agregación, requieren más estudios. El fibrinógeno parece juega un papel importante aunque experimentalmente se obtiene agregación con plaquetas lavadas (57).

A concentraciones débiles de ADP in vitro, la agregación es reversible y hay una desagregación espontánea que es probablemente debida a la destrucción de aquél por un enzima como ADP-asa que existe en el plasma (58). Estos enzimas parecen localizados en la sangre entera, en los leucocitos (61). Otros autores creen que la desagregación es por inhibidores competitivos del ADP.

Muchas hipótesis se han dado para el mecanismo de acción del ADP en la agregación plaquetaria, sin que hasta el momento esté aclarado, hecho que limita la comprensión y valoración de estas pruebas. Se han sugerido y solo las anunciaremos: unión del ADP con la membrana plaquetaria (62), con calcio y factor V formando puentes interplaquetarias (63), con calcio y magnesio dando también lugar a puentes, con calcio e hidrógeno como una reacción en cadena (64), puentes de atromiosina intraplaquetarios (65) por adsorción y cambios de la forma en las plaquetas (66), con proteínas de superficie plaquetaria (67), cambios de la estructura plaquetaria, etc.

Aunque no todos los autores están de acuerdo, parece que el cambio metabólico común por el que se agregan las plaquetas, es el ADP. Así sustancias como colágeno, adrenalina, etc. actuarían por intermedios del ADP (32).

Holmsem (44) distingue dentro del pool plaquetario de ADP, tres compartimentos: a. pool metabólico que incorpora  $p^{32}$  y no participa en el "release", b. pool no metabólico, liberado por los inductores del "release" y c. pool no metabólico que no está en equilibrio con el (b).

El ADP extrínseco proviene en su casi totalidad de los hematies.

Inhibidora de la agregación plaquetaria.

Durante estos últimos años han sido estudiados una multitud de sustancias que inhiben la agregación. Someramente y en una clasificación hipotética y parcial, vamos a ver algunas de estas sustancias. Los dividiremos dependientes de la fase del "release" en la que actúa (43).

A.- Inhibidores de la inducción: Dentro de ellos hay inhibidores específicos para ciertos inductores: adenosinas y sustancias análogas, derivadas del grupo pirimido-pirimidina y agentes antiadrenérgicos e inhibidores de todo inductor: agentes quelantes del calcio, arginina, guanidina y derivados y los productos de degradación del fibrinógeno.

A.- Inhibidores de la transmisión: AMP cíclico, activadores de la adenilciclasa (prostaglandinas  $E_1$ ) e inhibidores de las fosfodiesterasas (cafeína).

C.- Inhibidores de la producción de energía: Inhibidores de la glucólisis inhibidores de la fosforilación oxidativa, inhibidores de los grupos -SH, medicamentos antiinflamatorios y medicamentos antidepresivos.

D.- Inhibidores de la liberación de ADP en el medio extracelular: 1. Estabilizadores de membrana, medicamentos antiinflamatorios, medicamentos antidepresivos y serotonina, 2. heparina, 3. inhibidores de la trombostenina.

Electroforesis plaquetaria.

Ha sido muy estudiada por Hamptony Mirchell (68) que creen que es un buen método y dará mucha luz sobre la patofisiología plaquetaria. Abramson, en 1928, fue el primero en reconocer que las plaquetas están cargadas electronegativamente y era importante para que permanecieran separadas. (69). En 1958 Bangham introduce un aparato capilar para medir la movilidad electroforética plaquetaria. Con este aparato se han medido los cambios inducidos a la movilidad electroforética, por sustancias como ADP, ATP, noradrenalina, colágeno, etc. Algunas de estas sustancias requerían un cofactor no identificado, otros como ADP, no. Parece que el ADP cargado negativamente se uniría al calcio perdiendo parte de su carga y así se uniría a las plaquetas. Las otras sustancias actuarían transfiriendo ADP plaquetario de dentro al exterior de la membrana (70).

Factor 3.

El factor 3 es probablemente una lipoproteína por la cual las plaquetas contribuyen a la interacción de las proteínas plasmáticas en la coagulación de la formación del sistema intrínseco transplaquetario. Fue vista la importancia en este sistema por Biggs y Douglas en 1953 (71). Pantil y Ward creen que en las plaquetas circulantes normales el factor 3 no está disponible, sin embargo cuando el sistema es activado al máximo, disponibilidad del fosfolípidos hace del factor limitante de la tasa de formación de fibrina (72).

Para la disponibilidad de este factor han sido usados muchos métodos: tiempo de Stypven, test de Biggs y Douglas, método de Egli... etc.

Horowitz y Papayocanon han confirmado recientemente que el factor plaquetario 3 es activado por el ADP (73).

Los test de disponibilidad de factor 3 son anormales en la enfermedad de Glau mann en ausencia de agregación de plaquetas.

Factor 4.

En el servicio de coagulación que dirige el Profesor Castillo, el Dr. Domingo ha empleado el método de Younsel y cols. que se basa en la diferente actividad anti-heparínica que presenta el PRP agregado en relación con PRP sin agregar. Estas diferencias dan valoradas el factor plaquetario 4 (74,75).

Otros métodos han sido usados, el tiempo de sangría, consumo de protambina y retracción del coágulo, como medida indirectas de las funciones plaquetarias.

Plaquetas y trombosis.

El término Trombosis intravascular engloba un gran número de procesos patológicos y debe ser considerado distinto de la coagulación de la sangre.

Básicamente un trombo intravascular está compuesto de dos partes, una cabeza blanca compuesta fundamentalmente de plaquetas, fibrina y leucocitos y una de cola

roja que contiene hematies y fibrina. Hay gran variedad en las proporciones y distribución de los constituyentes del trombo.

En el trombo arterial las plaquetas son más abundantes que en el trombo venoso. El trombo, formado en la sangre estancada estructuralmente es equivalente a un coágulo formado "in vitro" (76).

No existe una técnica satisfactoria para reconocer un citado incipiente de trombosis en el trombo. Hay que recalcar que a partir de la necropsia no es posible reconstruir como se origina el trombo.

Las independencias de la triada de Virchow no fueron nunca dilucidadas y se ha seguido considerando la lesión vascular como causa primera de las trombosis.

Hoy día está fuera de dudas que la agregación plaquetaria es el mecanismo individual más importante en las trombosis arterial (77).

Los procesos de trombosis y hemostasia son similares y en ellos juegan un importante papel las plaquetas. Se han estudiado mucho las hemorragias por déficit de factores, pero no las trombosis (78).

Las primeras etapas de formación del trombo y sobre todo el estímulo inicial son los menos definidos. Casi todos los estudios experimentales han tenido como presupuesto el daño vascular. (Jones 1851, Rizzosero 1882, Eberth 1886). Honan y Mitchell (79) haciendo estudios en conejos demostraron que las sustancias agregadas son necesarias para estimular la formación de trombos en daños arteriales pequeños. Sugirieron que la pared arterial liberaría sustancias con propiedades similares a ADP y ATP. French y cols. con estudios electromicroscópicos demostraron que las plaquetas adhieren a las aperturas entre las células endoteliales en el vaso dañado. (80).

Sin embargo, se pueden formar trombos con daños endoteliales preceptibles (81). El proceso inicial en estos casos es también el agregado plaquetario.

Swyer y cols. usando estímulos eléctricos producen trombos en ausencia de cambios morfológicos en el endotelio. El significado de este experimento no está claro (82).

Alfols y cols. introdujeron un método de formación de trombos "in vivo" en animales de experimentación usando un rayo biolaser. Han obtenido efectos reproducibles y el método es utilizado para el estudio de agentes antiagregantes plaquetarios.

Hay evidencias que los enfermos predispuestos a tromboembolias tienen una supervivencia plaquetaria limitada y un "turnover" plaquetario más elevado que los sujetos control. El tabaco aumenta el rendimiento de acetilcolina, epinefrina y afecta la función plaquetaria in vivo, disminuida la supervivencia plaquetaria y aumenta el turnover.

conocimientos recientes hablan de la respuesta primera a las lesiones del agregado vaso de la unión de leucocitos al endotelio (84). Se formaría un agregado leucoplaquetario que se admite como reversible. Las sustancias que aumentan la agregación plaquetaria acentúan esta respuesta leucoplaquetaria, aunque en algunos casos se forma agregado masivo de hematies que debe considerarse como un tipo de trombo.

La formación de pseudópodos y otros morfológicos en las plaquetas "in vivo", parecen ser artefactos por las maniobras preparatorias para un estudio en el microscopio electrónico.

La relación plaquetas y coagulación de la sangre, parece importante en algunas trombosis. Tres tipos de mecanismo hay entre ellas: 1) Los efectos de la sangre alterada alrededor del agregado plaquetario. 2) los factores de coagulación adsorbidos en la membrana y 3) la malla de lipoproteínas del agregado plaquetario aprovechados para la reacción de coagulación.

La función anormal de las plaquetas se ha demostrado frecuentemente en los trastornos tromboembólicos.

Wright (1942) llamó la atención de estos procesos en el post-operatorio y su asociación era máxima en el décimo día del post-operatorio habiendo un aumento paralelo de la adhesividad plaquetaria (85).

Emmons y Mitchel estudiando la agregación con ADP es máxima en el décimo día post-operatorio yiviendo a niveles postoperatorios al cabo de un mes. Kellen demostró que la agregación seguía la misma curva anterior usando sangre entera y PRP. Estos cambios en adhesividad y agregación fueron interpretados los del 1º y 2º día debidos a los cambios en los hematies y del 3º al 10º día a la trombocitosis postoperatoria (86).

Negus y cols. encontraron estos aumentos de adhesividad y agregación el post-operatorio pero no había cambios significativos entre los pacientes que habían tenido trombosis venosas y los que no. (87).

Shapper no ha confirmado en 1968, los cambios de función plaquetaria en el post-operatorio y parte.

Trombosis venosas han sido demostradas en enfermos en los que la adhesividad plaquetaria estaba aumentada (88,89)

Estudios en enfermos con insuficiencia coronaria han dado resultados diferentes. Aumentos de adhesividad han sido encontrados usando la técnica de Wright con sangre entera, con técnica de adhesividad al vidrio (90). Incrementos en la agregación con ADP ha sido demostrado por Mesterl. Sin embargo Eisen y Stomorken (55) no han podido confirmar estos resultados. Zahavi y Dreykas describen diferencias en la agregación con ADP entre enfermos con infarto y controles normales:

- 1.- Elevación inicial en la D.O. no estuvo presente.
- 2.- Agregación plaquetaria que empezó inmediatamente.
- 3.- Agregación plaquetaria fue la más larga en duración y más grande en extensión.
- 4.- La desagregación fue mínima ó estuvo ausente.

Sjögrens y cols. sin embargo, no encontraron diferencias entre enfermos con infarto y sujetos normales. Rosner (92) aumenta la adhesividad al vidrio en infarto y tiende a normalizarse la cuarta semana (93).

Molten, Horliak y Murphy y Mandard encuentran diferencias significativas en enfermedades vasculares periféricas (94,95,96).

Poplawisky encuentra adhesividad aumentada en enfermos con hipertensión arterial. Ellos proponían que serían sustancias vasoactivas circulantes las que influyeran la adhesividad y agregación plaquetaria (97).

Danta en 1970, demostró que la cantidad de ADP necesaria para provocar la agregación plaquetaria en enfermos vasculares, fue significativamente menor, que en controles. En un 2º grupo tratado con Epiridanol la diferencia no fue evidente. Concluyó que la función anormal de las plaquetas se normalizaba en algunos enfermos cerebrovasculares. (98).

Tres factores diferencian la trombosis arterial de la venosa: 1. el daño vascular es menos importante en las venosas, 2. el sistema venoso es un sistema de corriente lenta sin embargo, en el arterial es muy rápida, 3. en el trombo venoso, la fibrina es el componente más importante. Parece incontrovertible que la trombosis venosa depende de la coagulación de la sangre y aquí parece que es donde entra en juego el concepto de hipercoagulabilidad.

Autores piensan que las trombosis en el colapso periférico ó la isquemia aguda puede iniciarse por la acción de endotoxinas bacterianas. Experimentalmente en conejos se producen trombosis masivas por preparados purificados de endotoxinas de E. Coli.

Cáncer-trombosis: Los posibles mecanismos son: 1. Invasión neoplástica de pared vascular, pero no explica trombosis a distancia, 2. Agregados plaquetarios sobre células neoplásticas pegadas a endotelio vascular, 3. Intensificación de coagulación intravascular crónica y subclínica, 4. Endocarditis trombótica no bacteriana. Igua- les mecanismos se simplifican en las trombosis venosas migratorias para neoplásicas (99,100).

El flujo de sangre es importante en la producción de trombosis. Variaciones en el flujo es un factor patogénético en las trombosis y sobre todo en el crecimiento subsiguiente una vez iniciado el proceso. Banmgartner en 1974 señala que los factores reológicos como velocidad de flujo y la presencia en plaquetas juegan un importante papel en la adhesión plaquetaria. La presencia de plaquetas de colagenasa y

materiales sensibles a tripina aumentan la adhesión. Estos estudios los hizo in vivo e in vitro.

Casi todos los estudios sugieren que el éxtasis por sí solo no puede iniciar una trombosis. A partir de los datos neclógicos, se supone que en éxtasis favorece el crecimiento del trombo en la fase plasmática. También por lógica los factores de la coagulación se encontrarían y podrían activarse unos a otros hasta producir la reacción en cadena de la coagulación. Es menos claro el que se neutralizarían los inhibidores circulantes y se evitaría su aclaramiento por el hígado.

Plaquetas y Arterioesclerosis.

La arterioesclerosis es una enfermedad de la íntima de las grandes y medias arterias caracterizada por la combinación de dos lesiones fundamentales microscópicas: la placa ateromatosa constituida de depósitos lípidicos y el espesamiento fibroso. (Lenegre)(101).

Duguid cree que el primer estudio sería la constitución de microtrombos naturales: fibrino substancia, trialina, colágeno y fibras elásticas (102).

Parece encontrado el papel de lípidos y plaquetas en la arterioesclerosis, lo que no es conocido es el factor ó factores de su localización y momento posterior.

Hay numerosos estudios susceptibles a complicaciones de enfermedades vasculares: Mc.Donald, Horlick, Evans e Irvine..etc. Se ha demostrado en las arterioesclerosis, relación entre el turnover y supervivencia plaquetaria y las complicaciones. Parece que el turnover y supervivencia reflejan la capacidad de las plaquetas para interactuar con los estímulos que producen la agregación. Mc.Donald y Edgill demuestran que en sujetos con dietas pobres en grasas disminuyen la adhesividad plaquetaria (104).

Los ácidos grasos producen agregación plaquetaria cuando la concentración de los saturados de larga cadena excede la capacidad de atar de la albúmina humana.

La integración plaquetas-leucocitos con la pared del vaso puede en áreas de turbias de flujo a cambios en la permeabilidad incrementándola. Este incremento puede seguirse de la acumulación local de beta lipoproteinas, como se vé en los primeros estadios de la arterioesclerosis (105).

Entre los factores asociados a enfermedades arterioescleróticas en el hombre las hiperlipemias hereditarias ó adquiridas, la hiper T.A. y la diabetes están en primer plano.

La primera lesión arterioesclerótica ha de ser considerada como lesión leposit (106). Kerr y cols. han podido demostrar la acción estimulante de los ácidos grasos de larga cadena sobre la agregación plaquetaria, así como la de diferentes fosfolípidos purificados, Recientemente se ha observado que las beta lipoproteinas

aumentan la capacidad agregante (107) del ADP y trombina. Este efecto podría explicar la frecuencia de trombosis en arterioesclerosis con tasa de beta lipoproteínas. Los quilomicrones aumentan "in vitro" la agregación plaquetaria solamente a concentraciones elevadas, lo que hace dudar de la posibilidad de efectos "in vivo". Otros autores han contrastado la relación entre tasa de triglicéridos y adhesividad en hiperlipemias. Parece que la longitud de cadena del ácido graso sea un factor importante (108).

Está bien demostrado que plaquetas y leucocitos causan daños focales en las aortas de conejo (109).

En enfermos arterioescleróticos la movilidad electroforética plaquetaria fue encontrada desigual y creyeron ver un rasgo comparable debido a anomalías en el plasma más que a las plaquetas mismas. (Hampton (110) y Mitchell). Esta cualidad electroforética fue demostrada para el ADP y no para la noradrenalina. Bolton y cols. (111) sugirieron la posibilidad de un factor transferible que causaron el aumento de sensibilidad a ADP con dos componentes, una lipoproteína de baja densidad (similar a lecitina) y un componente hábil que sería una enzima que convertiría la lecitina en lisolecitina. Estas anomalías de las plaquetas de enfermos arterioescleróticos inducida por estos lípidos no tiene una significación hoy día clara. Esta anomalía fue encontrada también en enfermos con esclerosis múltiple. Turpio y cols. demostraron un incremento de la sensibilidad al ADP en accidentes agudos y un aumento disociado en pacientes arterioescleróticos (112).

Hay estudios en los que la infusión de ADP en cerdos producen lesiones focales miocárdicas y circulación colateral. Junto a estos estudios en los que lesiones focales de agregados plaquetarios inducidos por ADP puede causar vasculitis (113).

Rayle y Butler han demostrado que la batazolidina y cortisona y no el ácido acetilsalicílico, inhibe el desarrollo de arterioesclerosis en conejos alimentados con yema de huevo. Parece que estos componentes ejercen su principal acción sobre las plaquetas (114).

Recientemente Cohen y McCombs han dado a conocer en el conejo la trombocitosis promueve la aparición de arterioesclerosis mientras que la trombocitopenia inhibe su desarrollo.

#### Plaquetas y Diabetes.

En algunos diabéticos parece bien demostrado el aumento de adhesividad in vivo e in vitro. Hellen y cols. han investigado 70 enfermos usando el test de columna de bolas de vidrio con sangre entera y PRP añadiendo ADP. La adhesividad plaquetaria en sangre total fue normal, pero estaba aumentada utilizando PRP en los pacientes que requerían insulina. El mismo incremento se vio en enfermos con complicaciones

nefropatía, neuropatía, retinopatía y vasculopatía periféricos. No encontraron correlación entre la adhesividad y las dosis de insulina, colesteroemia y glicemia (115).

La presencia de glucosa in vitro disminuye las funciones plaquetarias y prolonga su viabilidad (116). Se presume que su mecanismo de acción es a través de la síntesis y fosforilización del ATP. Otros autores obtienen estos datos in vitro pero sí en diabéticos después de darles 50 gr. de glucosa (117).

#### Anovulatorio.

Es un hecho clínico la frecuencia aumentada de accidentes tromboembólicos en las mujeres sanas que toman anticonceptivos. Por estudios estadísticos parece que el riesgo de padecer tromboembolia "idiopática" en mujeres con anticonceptivos en E.E.U.U. es de 1/2000, en Francia parece mayor 1/1000, enfrente del 1/20.000 de las que no los toman (118).

Parece comprobado que el riesgo es mayor cuanto más alta es la proporción de estrógenos y que se deberían retirar del mercado productos de más de 50 micras gr. de estrógeno. Pero esto no es todo, recientemente se describe la trombosis de la carótida metéfrica en una mujer de 28 años, tomando un tratamiento contraceptivo continuo con acetato de elormelidona, que es un progestágeno puro (119).

Por otra parte se han estudiado los efectos metabólicos de estos preparados y están comprobados, trastornos en el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono, aumentos de hierro, cobre, hidrocortisona, liroxina, y SH en suero, aumento de transaminasas y retención de la S.B.F. Aumento de los factores VIII, IX y fibrinógeno.

Con respecto a las plaquetas incrementos en la adhesividad están comprobados (120). También los resultados son discordantes, pero parece ser que la agregación plaquetaria aumenta con el ADP, esta irreversibilidad aumentada al ADP se cree debida a cambios lipídicos, concretamente para algunos al aumento de una lecitina-proteína de baja densidad. (121).

Según Jick y cols. la incidencia de trombosis venosas sería menor en las mujeres del grupo C, sin poder explicarse el hecho (122).

TABLA 2.- Efectos de Estrógeno-Progestágeno oral de terapéutica contraceptiva en Proteínas de suero.

Proteínas.	Efectos de contraceptivos oral.
Albumina	±
Prealbumina	+
Inmunoglobulinas	+
Alfa <sub>2</sub> -macroglobulinas	+
Antitripsina alfa <sub>1</sub>	++
Orogomucoide	-
Hepatoglobina	-
Transferina	+
Ceruloplasmina	+++
Tiroxina-binding globulina	++
Cortisol-binding globulina	++
Testosterona-estradiol-binding globulina	++
Fibrinógeno	++
Fibrinógeno	+
Renin substrato	+++
Renin	-

**TABLA 7.-** Observar y mirar las reacciones y relaciones del tipo y dosificación del Estrógeno en combinación con contraceptivos orales.

	Estrógeno				Total	
	Nestranol		Ethinil Estradiol			
	150 mg	100 mg	75-80 mg	50 mg	100 mg	50 mg
<b>Tromboembolismo venoso*</b>						
Observado (O)	58	333	80	22	21	266
Mirado (E)	31-71	281-90	85-76	19-42	11-1	350-20
Relación (O/E)	1-83	1-18	0-93	1-13	1-91	0-76
<b>Trombosis cerebral</b>						
Observado (O)	10	33	6	1	0	29
Mirado (E)	3-12	28-32	8-10	1-98	1-9	35-39
Relación (O/E)	3-21	1-17	0-66	0-51	-	0-82
<b>Trombosis coronaria</b>						
Observado (O)	6	26	2	2	2	23
Mirado (E)	2-32	21-62	7-12	1-78	1-11	27-5
Relación (O/E)	2-59	1-20	0-28	1-12	1-80	0-85

## HIPERCOAGULABILIDAD

Teóricamente todos los médicos hablamos de hipercoagulabilidad. El concepto que encierra este término no es claro, para algunos es un estado clínico, p. ej. Castillo, lo define como "estado en la formación del coágulo está más favorecida que lo normal ó su lisis está inhibida ó que ocurren ambas cosas a la vez"(123) para otros como Dikert y Strenli, sería "un estado en que los productos activos ó intermediarios ausentes en la sangre normalmente se encuentran en el espacio intravascular ó sean liberados a partir de los tejidos (124) y para otros serán una serie corta ó larga de pruebas de laboratorio las que daban el síndrome de hipercoagulabilidad.

Hemos de decir que creemos es un concepto totalmente subjetivo y muy difícil de definir en la actualidad por las pruebas de laboratorio.

La identificación de cada nuevo factor de coagulación, ha sido junto con la esperanza de hallarlo en estos enfermos que subjetivamente creemos tienen hipercoagulabilidad. Igualmente ha ocurrido con la puesta a punto de las pruebas funcionales plaquetarias.

La hipercoagulabilidad se ha relacionado como causa de trombosis, No está resuelto si es la causa ó el resultado de las trombosis. Sin embargo, hay que pensar como dice Castillo, que si la hipercoagulabilidad no es el factor más importante, de la formación de trombos, si es el más accesible a la terapéutica (123).

Argumentos en pro y en contra de la relación hipercoagulabilidad/trombosis, hay muchos y variados.

Para Castillo el diagnóstico de hipercoagulabilidad vendría dado por el estado de adhesividad y agregación plaquetaria, tromboelastograma am1-am2, tiempo de coagulación en vidrio siliconado, test de tolerancia la heparina in vivo y test de la resistencia a la heparina in vitro.

Muchos han sido los intentos de probar hipercoagulabilidad sistémica hasta ahora parecen estériles; faltan estudios para probar hipercoagulabilidades locales. Retrospectivamente podemos saber si se ha formado trombo por el hallazgo de productos circulantes de la degradación de la fibrina.

Nuevas técnicas como la dosificación de productos de degradación del fibrinógeno cuya presencia en sangre es una evidencia de la elaboración de trombina, e incipiente ó adelantada formación de fibrina. En la presencia de concentraciones apropiadas de sulfato de protónina, los complejos son encontrados disociados, resulta

do en la formación de fibrina. Esta coenzimática formación de fibrina, ha sido v  
bien llamada para coagulación. El test de diluciones de sulfato de proteonina  
(SDPS) diferencia los monómeros de fibrina de los complejos. Para V. Gurewich re-  
presenta un simple, sensible y específica prueba para los derivados del fibrinó-  
geno que son indicativos de trombosis. Aparece invariablemente positivo en CID,  
tromboembolismo pulmonar y usualmente positivo en las trombosis de zonas profun-  
das.

Ya Farreras en 1958 decía que no hay pruebas que detectan hipercoagulabilidad  
y cuando la detectan "in vitro" con frecuencia deja de registrarse una mayor asi-  
duidad en la sustarección clínica de las trombosis (121).

También se ha relacionado este estado hipercoagulable con la arterioesclero-  
sis, sobre todo a través de las plaquetas como expusimos antes.

## LIPIDOS

### PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS LIPIDOS.

La propiedad fisicoquímica más importante en los lípidos es la solubilidad.

Los lípidos son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Ellos sin embargo, presenta ciertas excepciones, por cuanto, por un lado la glicerina y algunos ácidos orgánicos son solubles en agua y por otro lado, no todos los lípidos son solubles en todos los disolventes orgánicos, algunos son insolubles, otros solubles en acetona y en éter y finalmente un tercer grupo no son solubles en éter. Este es precisamente el método idóneo para separar mezclas de lípidos, su distinta solubilidad en los disolventes.

Las propiedades fisicoquímicas de los glicéridos dependen fundamentalmente de los ácidos grasos que los constituyen, así los aceites vegetales, con líquido por poseer ácidos desaturados, en tanto los grasos animales son sólidos a temperatura ambiente debido a los ácidos grasos saturados, como palmítico y esteárico.

Para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de una grasa se emplean una serie de índices.

Índice de iodo se expresa como el peso del iodo, en gramos fijados por 100 de lípidos, estando en relación con el número de dobles enlaces presentes en las cadenas de ácidos grasos de los lípidos.

El índice de acitilo está en relación con las funciones simples que pueden estar presentes en las cadenas de ácidos grasos.

Tratando una grasa con solución alcohólica de hidróxido potásico calentado y un refrigerante a reflujo, se liberan los ácidos grasos y combinando con el alcohol forman jabones. El índice de saponificación es tanto más pequeño en cuanto mayor sea el pesomolecular de los ácidos grasos. Proporciona por tanto, este índice una indicación sobre la longitud media de las cadenas integrantes.

El índice de peróxidos, valora la proporción de ácidos grasos libres existentes en una solución de lípidos.

Refiriéndose a los problemas fisicoquímicos en los lípidos orgánicos interesa precisar dos aspectos distintos: la extracción total y fraccionada y posteriormente la hidrólisis y el análisis de los constituyentes.

### ANALISIS DE LIPIDOS.

Los lípidos se presentan en la materia viva bajo formas diversas, en ocasiones en forma libre, como las inclusiones de tejido adiposo, pero la mayoría de veces están más ó menos ligadas a las proteínas ó glúcidos constituyendo elementos celulares diversos (membranas, cromosomas, mitocondrias, etc) En estos casos sus propiedades de solubilidad son modificadas, así por ej. no se consigue extraer

líquido en el suero con disolventes no polares ó poco polares, como éter de petróleo, éter etílico y cloroformo, en cambio se consigue perfectamente, si se mezcla éste disolvente con uno polar, ó sea, suero disol. polar, soluble en agua con metanol, ó etanol. En general por tanto, conviene efectuar la extracción de los lípidos, mezclar los dos tipos de disolventes, los más usados con éter-etanol ó mejor cloroformo-metanol (2/1 ó 1/1).

A.- El primer paso para efectuar cuando interesa hacer una extracción de tejido orgánico, es la destrucción de este tejido, que puede realizarse mediante un homogenizador poniendo en contacto el tejido con el agente extractor (cloroformo-metanol 2:1) y destruyendo las estructuras celulares. Actualmente da muy buenos resultados el empleo de criostato, que produce una deshidratación del tejido y mediante cortas de 20 mm. se coloca el tejido sobre el portaobjetos, añadiendo una décima de mm. de cloroformo-metanol encima, se consigue una extracción bastante importante. Este método de gran importancia clínica se emplea para el estudio de los lípidos cerebrales.

B.- Conseguida la extracción con unos disolventes apropiados, cuando se está ante la mezcla de lípidos desconocida, se puede fraccionar de acuerdo con su solubilidad, lo que permite reunir a los lípidos en tres grupos.

a) Los lípidos solubles en acetona, comprenden: glicéridos, estéridos, cétidos ácidos y alcoholes grasos y esteroides.

b) Lípidos insolubles en acetona pero solubles en éter, de los cuales pueden distinguirse dos grupos: un primer grupo soluble en etanol (cefalina) y un segundo grupo insoluble en alcohol que comprende fosfatidilinositol, glicerofosfátidos

c) Lípidos insolubles en éter, comprende las esfingomielinas y los cerebrósidos que pueden separarse entre sí mediante el ácido acético glacial caliente, con el que se precipitan los cerebrósidos y permanecen en solución las esfingomielinas

d) Una vez extraídos y fraccionados los lípidos de un tejido biológico interesa proceder a su análisis procediendo en primer lugar a la hidrólisis con objeto de analizar cada uno de los componentes de una fracción determinada.

Los hidrolizados de los lípidos se dividen en tres grandes grupos:

1. Ácidos grasos solubles en agua en medio alcalino, (en medio ácidos son insolubles), de donde se los extrae con éter.

2. La fracción llamada insaponificable que es insoluble en agua en medio alcalino y soluble en éter etílico ó éter de petróleo comprende: alcoholes grasos, aldehidos, esteroides y esfingosina. Finalmente, la fracción hidrosoluble que comprende glicerol, ácido fosfórico, colina, aminoetanol, glúcidos, inositol y aminoácidos.

3. Lipoproteínas.

## METABOLISMO DE LOS LIPIDOS.

Este es uno de los capítulos más interesantes y más complejos de la bioquímica de los lípidos. Vamos a desarrollarlo sucintamente puesto que no sería apropiado teniendo en cuenta el tipo de trabajo, hacerlo extensamente. Por otra parte, creemos que es un aspecto fundamental a tratar para comprender muchos aspectos de la patología de las dislipemias y sus posibles relaciones con las pruebas plaquetarias.

### a) Digestión y adsorción intestinal.

La mayor parte de las grasas ingeridas son triglicéridos y secundariamente fosfolípidos y colesterol. Los triglicéridos están esterificados por ácidos palmítico ( $C_{16}$ ) y esteárico ( $C_{18}$ ) y en menor proporción por el oleico ( $C_{18:1}$ ) y linoleico ( $C_{18:2}$ ).

En el estómago prácticamente no existe la digestión de los lípidos, por lo que la mayor parte de ellos pasan al duodeno sin sufrir ningún proceso. Allí tienen lugar la emulsión, cuyos componentes más importantes son los triglicéridos, los ácidos grasos y las sales biliares.

La emulsión a las grasas para la hidrólisis que tiene lugar en dos fases: en la luz del intestino por la acción de la lipasa pancreática y en las células de la mucosa por la lipasa intestinal. La lipasa pancreática que ataca las grasas emulsionadas en la luz del intestino, es una esterasa del grupo, que hidroliza los triglicéridos hasta formar ácidos grasos y 2 monoglicéridos, éstos si bien no son atacados por la lipasa, fácilmente pueden transformarse en 1 ó 3 monoglicéridos puesto que el enlace éster es de bajo nivel energético (DAVENPORT).

La hidrólisis de los 3 monoglicéridos puede tener lugar dentro de las células de la mucosa, que contiene en el microsoma una lipasa que hidroliza, además los triglicéridos de cadena corta.

En el páncreas se produce además una lecitinasa A que actúa sobre los fosfolípidos ingeridos y produce lisolecitina que se adsorbe.

A medida que progresa la hidrólisis, los monoglicéridos y los ácidos grasos libres forman una solución nuclear con sales biliares. Las micelas por el hecho de ser liposolubles, pueden penetrar en la fase lipídica de la membrana celular.

En el interior de las células de la mucosa los monoglicéridos son hidrolizados por lipasa intestinal formando ácidos grasos libres y glicerina.

En las células de la mucosa intestinal los productos de la digestión grasa adsorbidos, como son: glicerol, ácidos grasos libres y lisolecitina, sufren procesos metabólicos de resíntesis y numerosos intercambios entre sí, catalizados por enzimas situados en los microsomas del retículo endoplasmático, produciéndose

nuevos triglicéridos y fosfolípidos que atravesando las células por el citado retículo, se conglomeran en gotitas llamadas quilomicrones de 0,1 a 3,4  $\mu$ m. de diámetro que van por la linfa. Estos quilomicrones contienen 89-93% de triglicéridos, 5,8% de fosfolípidos, 0,7-1,5% de colesterol, 1,7% de ácidos grasos libres, 0,5% de proteínas. (DAVEYPORT).

La mayor parte de los ácidos grasos de cadena corta y de cadena mediana y una parte de colesterol, son derivados a la sangre de la vena porta.

Los quilomicrones, llamados también partículas exógenas, van a los linfáticos intestinales y posteriormente al conducto torácico. Son hidrolizados en las células de tejido adiposo, hígado, corazón y otros órganos y las grasas ácidas que vendrán en la resistencia de otros ésteres en el interior de la célula.

En el plasma humano, además de los triglicéridos de procedencia alimenticia (partículas exógenas), existen otros sintetizados principalmente en el hígado, demostrable por cuanto un sujeto en ayunas puede hallarse concentraciones de triglicéridos de procedencia exógena que oscilan entre 10-150 mg. por 100 ml. Así como los triglicéridos de procedencia exógena van ligados a los quilomicrones, los sintetizados en la célula hepática van vehiculizados en la fracción pre-beta-lipoproteína. Las "partículas endógenas" difieren de los quilomicrones no solamente en su origen y las propiedades físicas, sino además tienen distinto contenido de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos (FREDRICKSON y cols. 1967).

Usualmente de 100-500 mg. de colesterol son adsorbidos al día, de procedencia alimenticia a los que hay que añadir otro gramo de colesterol reabsorbidos por la luz intestinal procedentes de la secreción biliar. Tanto el colesterol exógeno como el endógeno, es habitualmente transportado de tejido a tejido en forma de alta y beta-lipoproteínas. Existe un rápido intercambio de colesterol libre entre los transportes de los tejidos, especialmente entre plasma, hígado, hematies y para algunos en plaquetas.

En cuanto a los fosfolípidos, los más importantes en el suero son: la fosfatidilcolina y esfingomielina, estas moléculas tienen el transporte específico de ácidos grasos entre tejidos.

Los ácidos grasos libres, cuyas concentraciones plasmáticas oscilan entre 0,3 y 0,7 mg/1 de plasma, van ligadas a la albúmina. Son una piedra fundamental en el dinámico metabolismo lipídico y proceden del tejido adiposo subcutáneo, las procedencias de quilomicrones (vía intestinal), lipoproteínas (células hepáticas) y ácidos grasos libres (célula adiposa).

Como resumen de este apartado, una sinopsis de la forma como van vehiculizados las fracciones lipídicas del suero (Según BOBERG y CARLSON).

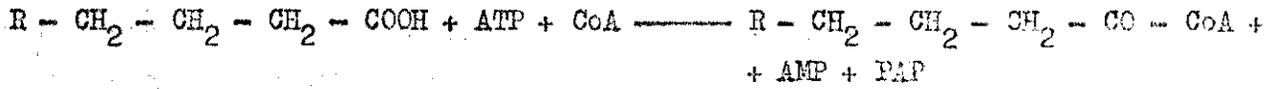
FORMA	NOMBRE	PROCEDENCIA
Emulsión	Quilomicrones	Exógena
Complejo macromolecular	Lipoproteínas y pre.	Endógena
Ligado a albúmina	Ácidos grasos Libres	Endógena

b) Metabolismo de los ácidos grasos.

Catabolismo.

Los ácidos grasos se catabolizan en la mitocondria principalmente por oxidación siendo una de las sustancias más importantes producidas, el acetil CoA, que se forma en el curso de una serie de reacciones que vamos a esquematizar.

La primera fracción consiste en la formación de un tioéster de un ácido graso a reaccionar éste con CoA, en la reacción participa ATP. Catalizan acil-CoA específicas para ácidos grasos de determinada longitud de cadena.



La segunda reacción consiste en una deshidrogenación catalizada por la Enolpiruvato deshidrogenasa.



La tercera reacción que se produce es una beta deshidratación catalizada por una EnolCoA hidratasa.



A continuación se produce una deshidrogenación con formación de un compuesto beta catónico catalizada por una beta-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa con formación de un compuesto beta catónico catalizada por una beta-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa siendo el coenzima NAD.



La última reacción de la cadena es una rotólisis del enlace beta-catónico catalizada por una beta-cetoacilCoA y un tioéster de un ácido graso con dos carbonos menos que el original.



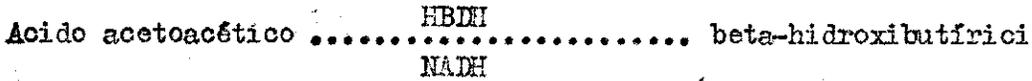
El tioéster del ácido graso resultante va a sufrir nuevamente todas las reacciones señaladas hasta ceder otros dos carbonos y formar otra nueva molécula de CoA.

Mediante la beta-oxidación los ácidos grasos de número par de átomos de carbono se degradan hasta formar moléculas de AcetilCoA. Estas moléculas pueden seguir dos caminos metabólicos ó bien produciendo energía siguiendo el ciclo de Krebs, ó bien

participar mediante reacciones de transacetilación de síntesis de otros compuestos. Debido a la acumulación de pequeñas cantidades de AcetilCoA, colateralmente se condensan 2 moléculas según la siguiente reacción:



A continuación por la acción de una tioesterasa se forma ácido acetoacético, el cual puede reducirse a beta-hidroxi butírico ó descarboxilarse espontáneamente formando acetona.



Estos procesos de formación de acetoacético, beta-hidroxi butírico y acetona, se llaman catogénesis y estas tres sustancias se llaman cuerpos cetónicos. En el sujeto diabético este proceso ocurre con bastante intensidad,



Recibe el nombre de cetolisis la oxidación completa de los cuerpos cetónicos que tienen lugar en el riñón y músculo por la vía del ciclo de Krebs.

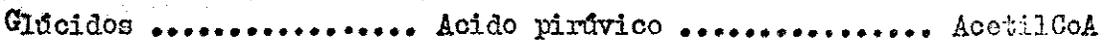
Cuando existe un acúmulo de cuerpos cetónicos en la sangre (cetonemia) y en la orina (cetonuria), estamos en presencia de una alteración metabólica llamada verbalmente cetoacidosis grave, puede terminar en acidosis, como ocurre p.ej. en la diabetes no tratada.

Además de la beta-oxidación descrita, se conoce la oxidación que tiene lugar en el carbono más alejado del grupo carboxílico, produciéndose un ácido carboxílico que a su vez va sufriendo una degradación a nivel del carbono (libre) beta.

Se supone que en la naturaleza se produce además de la alfa oxidación puesto que en los esfingolípidos cerebrales existen alfa-hidroxiácidos que se producirán por el mecanismo señalado.

Síntesis de ácidos grasos.

La piedra básica para la síntesis de ácidos grasos es el acetilCoA, el cual procede esencialmente del metabolismo de los glúcidos y aminoácidos glucogénicos. Por otra parte, los aminoácidos catógenos forman acetato y acetoacetato, lipógenos ambos.



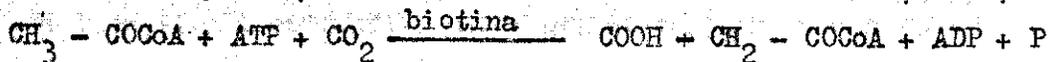
Aminoácidos.

Acetato ó acetoacetato.

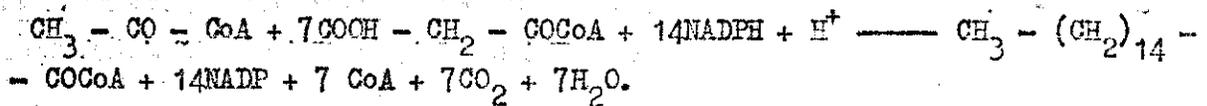
Existen dos vías metabólicas distintas, una dentro y otra fuera de la mitocondria.

Vía extramitocondrial.

La primera reacción importante consiste en la incorporación de CO<sub>2</sub> a AcetilCoA en ella participan ATP y biotina y se forma malonilCoA.



A continuación una molécula de acetilCoA se condensa con 7 moléculas de maloni CoA en una serie de reacciones en que tiene lugar descarboxilación, deshidratación formándose PalmitilCoA. En esta reacción participa como coenzima el NADP reducido, que procede de la vía de la pentosa.



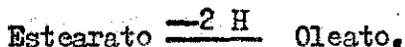
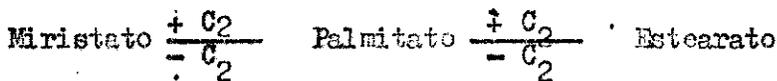
Por la acción del tioesterasa el palmitilCoA se convierte en ácido palmítico.

Esta vía extramitocondrial está regulada como describiremos más adelante, en sentido de estimulación, por la insulina, la vía de la pentosa y el citrato. Producen inhibición de estas reacciones la retroalimentación negativa de AcetilCoA con la acetilCoA carboxilasa y la citrosintasa.

Vía intramitocondrial.

La vía intramitocondrial de síntesis de ácidos grasos es prácticamente la inversión de la degradación citada anteriormente. Consiste en la condensación de AcetilCoA en el extremo carboxílico de una molécula de AcetilCoA. A continuación tiene lugar una reducción deshidratación y reducciones sucesivas que forman un AcilCoA con dos carbonos más de longitud. Se considera que esta segunda vía para la síntesis de A.G. se utiliza para alargar la cadena de los mismos y no para neosíntesis.

Aparte de la síntesis de ácidos grasos existen mecanismos para alargar ó acortar las cadenas, así mismo para dehidrogenarlas.



Al parecer la neosíntesis produce fundamentalmente ácido palmítico y los demás ácidos grasos se producen por éstos últimos mecanismos señalados.

La facultad del organismo animal para desaturar los ácidos grasos parece tener límites, Algunos ácidos grasos poliinsaturados son elementos esenciales para el ser humano, citaremos: linoleico, linolénico, araquidónico.

Metabolismo de glicéridos.

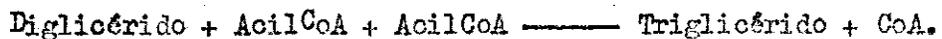
Los glicéridos están compuestos de glicerol y de grasas. Hemos ya considerado la síntesis y degradación de éstos, vamos a ver el de la glicerina.

La glicerina proviene del metabolismo de los glúcidos, concretamente del fosfato de dihidroxiactona.



Si bien el glicerofosfato puede ser hidrolizado por una fosfatasa ó fosfato inorgánico y glicerol libre, la síntesis de glicéridos se efectúa a partir de alfa-glicerofosfato + AcilCoA  $\longrightarrow$  ácido-L-alfa-lisofosfatídico + AcilCoA  $\longrightarrow$  ácido-L-alfa-fosfatídico + CoA.

Por hidrólisis del ácido fosfórico, mediante la acción de una fosfatasa de ácido fosfatídico se convierte en monoglicéridos por hidrólisis de un glicérido con un radical ácido ó bien es capaz de transformarse en triglicérido en el curso de un AcilCoA.



En los triglicéridos de animales un tercera parte de ácidos grasos son saturados (predomina el ácido palmítico).

El catabolismo de los glicéridos es muy simple; consiste en la hidrólisis de los ácidos grasos por la cual se separa la glicerina, catalizan la hidrólisis lipasas celulares. Los ácidos grasos siguen las reacciones de beta-oxidación ya mencionadas y el glicerol se incorpora nuevamente a la cadena de intermediarios glucolíticos.

#### Metabolismo de fosfolípidos.

##### Catabolismo.

Las reacciones de degradación de los fosfolípidos son semejantes a las que ocurren en el aparato digestivo, en ellas actúan lecitinas y fosfodiesterasas.

La vía principal para lecitinas, cefalinas, serínfosfatídicos, consiste en la sucesión de reacciones. La primera es una hidrólisis por la que se separa el ácido graso no saturado en posición beta, quedando un lisofosfato. Por hidrólisis se separan el ácido graso situado en posición alfa. Posteriormente el glicerolforil-base se separa la base (etanolamina, colina, serina e inositol), quedando alfa-glicerofosfatídico que sigue las vías metabólicas del metabolismo glicólico ya señalados.

Otra vía demostrada metabólica y que al parecer es la principal para el inositol fosfato, consiste en la separación de diglicéridos, quedando el inositolfosfato que posteriormente se hidrolizará.

La esfingomileina se degrada en la primera reacción quedando fosforilcolina y acelsfingosina. El primer compuesto sigue el mismo proceso señalado en la vía metabólica secundaria, en tanto la N-acilasfingosina experimenta hidrólisis por la acción de una amidasa.

##### Síntesis.

La síntesis de fosfolípidos tiene lugar en todos los tejidos, sin embargo la importancia de ésta síntesis varía. En la mayoría de los tejidos la síntesis y degradación de los fosfolípidos se verifica en la propia célula en tanto el hígado parte de los fosfolípidos que sintetiza van al plasma.

Es muy distinto el recambio de fosfolípidos de unos tejidos a otros. Entre los más activamente sintetizados tenemos, hígado, intestino y riñón. A estos les sigue

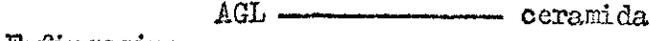
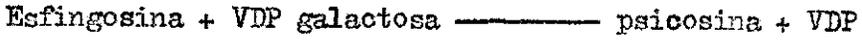
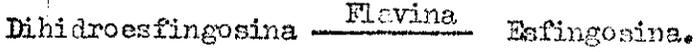
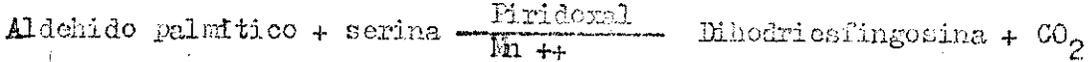
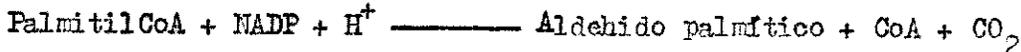
el páncreas, suprarrenal, pulmonar. Músculos y cerebro son los órganos con un recambio más bajo.

En la fase inicial de la síntesis de fosfolípidos el proceso es común con la síntesis de glicéridos, es decir, el ácido L-alfa-fosfatídico. De los restantes componentes de los fosfolípidos la serina procede del metabolismo de los prótidos. La etanolamina separa por descarboxilación de la serina. La colina procede de las metilaciones sufridas por la etanolamina.

Etanolamina y colina participan en la síntesis de los fosfolípidos en forma de nucleótidos de citidina.



Al parecer la esfingosina se produce al combinarse ácidos grasos y serina según las reacciones siguientes:



(HILDEBRAND y cols. 1970).

El fosfato de etanolamina y el fosfato de colina se forman por reacción de un glicérido de citidina-difosfato-etanolamina y citidina-difosfato-colina. La fosfatidilserina, procede de las fosfatidiletanolamina.

El fosfatidilinositol se forma al reaccionar la citidina-difosfato-diglicérido con inositol.

La esfingomielina se produce con la N-acetilación de la esfingosina por un acil-CoA. La ceramida formada reacciona con COC para obtener la esfingomielina.

a) Metabolismo de los glucolípidos.

El metabolismo de los glucolípidos no está todavía totalmente esclarecido. Los productos básicos para la síntesis son esfingosina cuyo origen hemos ya considerado, la glucosa, galactosa y N-acetilgalactosa en forma de derivados VDP, el ácido siálico en forma de CMP-N-acetilneuramínico. El sulfato para la formación de los sulfátidos, procede de fosfoadenosinfosfosulfato (PAPS). En la figura 8 tomada de BURTON, se expresa las vías metabólicas de síntesis y catabolismo de los glucolípidos. Algunas vías son bien conocidas otras son hipotéticas.

Regulación del metabolismo lipídico.

En la regulación del metabolismo lipídico, el tejido adiposo desempeña un importante papel, los lípidos son adsorbidos por vía intestinal y circulan parcialmente con

los quilomicrones y lipoproteínas hasta la célula hepática. El tejido adiposo participa en el Pool de los A.G.L. que circulan unidos a la albúmina.

El tejido adiposo constituye un gran almacenamiento de energía del organismo en forma de glicéridos. Este almacenamiento no es pasivo, puesto que constantemente se sintetizan triglicéridos que se depositan (lipogénesis) y por otra parte de estos se liberan A.G.L. que son utilizados como fuente de energía (lipólisis).

Las acumulaciones de glicéridos se verifican en el organismo en tres lugares principales, el tejido conjuntivo subcutáneo, el tejido conjuntivo muscular y la cavidad abdominal.

Los ácidos libres plasmáticos, están en equilibrio con el pool de A.G. tisular. Aquellos aumentan por las reacciones de lipólisis y disminuyen en la resíntesis de lípidos intracelulares.

La regulación del metabolismo lipídico corre a cargo de mecanismos nerviosos y hormonales.

Se han descrito como hormonas que actúan en la lipogénesis la insulina, la ostiasina, la prolactina y probablemente la prostaglandina.

Se comportan como agentes lipolíticos ó adipocinéticos las cetocolaminas, secretina y como permisivas las hormonas tiroideas y los glucocorticoides.

## METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol humano tiene una doble procedencia alimenticia ó de síntesis endógena. Este se verifica en todas las células vivas, destaca el hígado y las cápsulas suprarrenales. La síntesis en el cerebro, si bien es el lípido mayoritario, es muy lenta. Se ha calculado en 1 gr. la cantidad de colesterol diaria sintetizado por el organismo.

### 1. Anabolismo del colesterol.

Siguiendo el esquema expuesto por POLONOUSKI y cols., consideramos el proceso de síntesis del colesterol en 5 fases:

#### 1) Condensación de AcetilCoA.

El AcetilCoA procedente de las metabólitos lipídicos y glucídicos, se condensa en dos fases, catalizando la primera una acetiltransferasa y la segunda una enzima de condensación.

La incorporación de una nueva molécula de acetilCoA a AcetoacetilCoA, forma beta hidroxí beta metilglutamilCoA.

#### 2) Formación de ácido mevalónico.

La beta hidroxí-metilglutamilCoA sufre un proceso de reducción hasta ácido mevalónico. Esta reacción de gran importancia en la síntesis de colesterol, está catalizada por la beta-hidroxí-betametilglutamilCoA reductasa con el concurso de  $\text{TPNH}_2$ . En esta reacción hay un mecanismo de retroinhibición al inhibir la presencia de colesterol la reducción a ácido mevalónico.

#### 3) Fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico.

El ácido mevalónico sufre transfosforilaciones y una descarboxilación convirtiéndose en Isopentenilpirofosfato que se comporta como Isopreno activo.

La primera reacción cataliza la mevalonatoquinasa y la segunda la fosfomevalonatoquinasa.

El ácido pirofosfomevalónico y la segunda sufre una nueva fosforilación y una descarboxilación hasta la formación de Isopentenilpirofosfato.

#### 4) Formación de escualeno.

El isopentenilpirofosfato catalizado por una Isomerasa se convierte en dimetilacetilpirofosfato que por condensación de varias moléculas se convierte en escualeno.

2 Dimetilacetilpirofosfato

Geranylpirofosfato

Geranylpirofosfato + Dimetilacetilpirofosfato Farnesilpirofosfato

Por condensación reductora de Farnesilpirofosfato con el concurso de  $\text{TPNH}_2$  se obtiene escualeno.

2 Farnesilpirofosfato +  $\text{TPNH}_2$

$\text{TPN} + 2$  Pirofosfato + escualeno.

El escualeno es el precursor inmediato del colesterol que se encuentra en la mayoría de los tejidos.

### 5) Ciclación del escualeno.

El escualeno sufre dos procesos metabólicos una oxidación centralizada por la escualeno-oxidasa y por otro la óxido-escualenocidasa, convirtiéndose en un esterol llamado Lanosterol.

El lanosterol oxida hasta Zimosterol el cual por deshidrogenación puede formar 7 dehidrodemosterol, es cual tiene dos posibilidades metabólicas ó bien la vía del demosterol ó bien el 7 dehidrocolesterol, desembocando las dos a colesterol.

### 2. Eliminación y degradación del colesterol.

El colesterol orgánico puede sufrir la eliminación fecal, la degradación de ácidos biliares ó el peso metabólico hacia los esteroides hormonales.

#### a. Eliminación fecal.

Aproximadamente 0,7 gr. de colesterol diarios son eliminados por las heces. Las bacterias intestinales lo transforman en coprosterol por reducción.

#### b. Formación de ácidos biliares.

Una importante proporción de colesterol se transforma en ácidos biliares. El colesterol por oxidación se convierte en 7 alfa-hidroxicolesterol, que por otra parte de 2 hidrógenos, se transforma en  $A_4$  7 alfa-hidroxicolesterolona, la cual por reducción obtenemos ácido quenoderoxicólico (3 alfa, 7 alfa hidroxicolánico).

Por otra parte la 7 alfa-hidroxicolesterolona, por oxidación pasa a 7 alfa, 12 alfa-dihidroxicolesterolona, que por reducción se convierte en 7 alfa, 12 alfa-dihidroxicoprosterona y 7 alfa, 12 alfa-dihidroxicoprostanol. Por oxidación, esta se convierte en ácido cólico (3 alfa, 7 alfa, 12 alfa-trihidroxicolánico). Para la conversión en los ácidos biliares en los conjugados de taurina y glicina existe una transformación bioquímica consistente en la activación con acetilCoA de la función ácido formando colil Coenzima A que se combina con glicocola y taurina, formando ácidos glicol y taurocólicos.

#### c. Esteroides hormonales.

El peso inicial consiste en oxidaciones de la cadena lateral de colesterol catalizado por la colesterol desmolada, convirtiéndose en pregnolona, que posteriormente por numerosos procesos metabólicos, se convertirá en progesterona, etc.

## LIPOPROTEINAS.

Las proteínas del suero ejercen un papel muy importante en el transporte de los lípidos. Este transporte se verifica, principalmente, por las globulinas a la que se considera como lipoproteínas verdaderas. La albúmina sirve únicamente para el transporte de los ácidos grasos libres, siendo liberados del complejo albúmina-ácidos grasos libres en diversos órganos y tejidos del organismo.

La unión de los lípidos con las proteínas fue sospechada hará aproximadamente un siglo, cuando al tratar de extraer los lípidos del suero solo se obtenía una pequeña cantidad de los mismos. Los primeros trabajos para aislar compuestos se deben a MACHEBOEUF en el año 1929 quien logró aislar un producto soluble que calificó de "sinopsis lipoproteicas ácido precipitable". Pero fue TISELIUS quien dio la prueba objetiva de la existencia de las lipoproteínas al verificar la electroforesis del suero antes y después de su deslipidización, sin desnaturalizarlo y observar la consiguiente reducción de los valores de las globulinas alfa y beta.

La investigación sobre lipoproteínas fue estimulada a partir del año 1940, con el empleo de técnicas de ultracentrifugación y fraccionamiento por precipitación. GOFFMAN y cols. 1949, demostraron que las anomalías observadas en la ultracentrifugación del suero total eran debidas a las lipoproteínas contenidas en el mismo, las cuales determinan un efecto JOHNSTON-OGSTON. La ultracentrifugación-flotación en soluciones de mayor densidad eliminaba tales anomalías. En la actualidad las técnicas de flotación según GOFFMAN son la base de varios métodos analíticos y preparativos.

La densidad de las lipoproteínas séricas es inferior a la unidad, por lo que incrementado la densidad del suero, añadiendo cloruro sódico, se pueden separar las lipoproteínas según la velocidad de flotación. Al aumentar la densidad del solvente las sustancias de peso específico inferior al medio ascienden hacia la superficie en el campo gravitatorio de la centrifuga-flotación. La velocidad de flotación es determinada por el valor negativo de la velocidad de sedimentación expresada en unidades Svedberg.

$$1 \text{ Sf} = - 1 \text{ S}$$

La diferente densidad de los cuatro grandes grupos de lipoproteínas permite su separación e identificación. Si con la técnica de ultracentrifuga-flotación se opera con una densidad de 1063 g/c.c. de NaCl a 26°C se obtienen las siguientes clases: Quilomicrones, con densidad inferior a 0,95 y Sf 400, corresponden a la banda que aparece en el electroferograma en el punto de partida. Las lipoproteínas de muy baja densidad señaladas por VLDL (very low density lipoproteins) con una dens.

T A B L A I  
XV

LÍPOPROTEÍNAS

(BRAGDON, según FREDRICKSON 1.963)

Fracción	Dens.	SJ	Coolest. libre	Fosfol.	Glicéridos.	Proteínas
Quilomicrones	1006	400	3,1	7,1	81,3	2,5
Lipo baja D (pre-beta)	1019	12-400	6,2	17,9	51,9	7,1
Lipo baja D lípoproteínas	1019	0-12	8,5	23,6	5,1	20,5
Lipo elevada densidad	1063	—	2,3	26,9	4,6	47,7
Lípoproteínas	1,21					

T A B L A I  
XVI

VARIACION DE LOS LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS DEL PLASMA DE ACUERDO CON LA EDAD. (SEGUN FREDRICKSON Y COLS. 1967).

Edad	Coolest. Total.	Triglicer.	Pre-beta Coolest.	Beta Coolest.	Alfa Varones	Coolest. Hembras
0-19	120-230	10-140	5-25	50-170	30-65	30-70
20-29	120-240	10-140	5-25	60-170	35-70	35-75
30-39	140-270	10-150	5-35	70-190	30-65	35-80
40-49	150-310	10-160	5-35	80-190	30-65	40-85
50-59	160-330	10-190	10-40	80-120	30-65	35-85

dad entre 0,95-1006 y Sf entre 20-40. Aparecen en la electroforesis en la región prebeta.

Lipoproteínas de baja densidad (6 beta lipoproteínas pasadas en oposición a las anteriores 6 pre-beta) señaladas por LDL (low density lipoproteins) con densidades que oscilan entre 1006 y 1063; Sf entre 0-20 y que corresponden a las lipoproteínas beta del electroferograma.

Al objeto de aislar las lipoproteínas de alta densidad es preciso que el medio posea una densidad de 1,21 g/c.c. a 26°C expresándose el coeficiente negativo de sedimentación por  $F_{1,21}^{-}$ ; en tales condiciones la velocidad de flotación oscila entre 0,9. Estas proteínas poseen una densidad entre 1,21 y 1,31 y corresponden a las alfa-globulinas y corresponden a las llamadas lipoproteínas alfa, conocidas por HDL (high density lipoproteins = lipoproteínas de alta densidad) y VHDL (very high density lipoproteins = lipoproteínas de muy alta densidad).

Mediante la electroforesis sobre papel y después de la tinción con un colorante adecuado para las grasas (Sudán negro, Sudán III, etc) se obtienen tres bandas: quiloniocrones desde el depósito hasta la beta-lipoproteína; la betalipoproteína y la alfa-lipoproteína. En algunos casos se observa, bien delimitada, una estrecha banda por delante de la región de las beta-lipoproteínas y que corresponde a las prebeta lipoproteínas. Las proporciones beta-alfa en suero de individuos normales es de 1, 3,4, valor medio 2,16 (WUHRMANN) y de 1,02-2,10 con un promedio de 1,62 según GRIS LIESS y HEMPEL emplean un tampón veronal de pH = 8,6 al que añaden 1% de albúmina humana ó bovina y 0,0001 M de EDTA; el electroferograma teñido con aceite rojo O, permite visualizar cuatro bandas de lipoproteínas: quiloniocrones, betalipoproteínas, prebeta-lipoproteínas y alfa-lipoproteínas. Cuando la tasa de triglicéridos es más alta predominan las prebeta-lipoproteínas y alfa lipoproteínas. Cuando la tasa de triglicéridos es inferior a 100 mg/100 c.c. no son visibles la banda de quiloniocrones y la de prebeta-lipoproteínas. Se dan como valores medios de éstas fracciones los siguientes: alfa-lipoproteínas 17%; beta-lipoproteínas 66%; prebeta-lipoproteínas 17%.

COLFS y VERHEYDEN disminuyen el carácter lipófilo de las tiras de cellogel tratándoles con álcali con lo que el acetato de celulosa se transforma en celulosa. Coloreada la tira del electroferograma aparecen cuatro bandas: pre-alfa<sub>1</sub>-lipoproteína, alfa<sub>1</sub>-lipo; alfa<sub>2</sub>-lipo y beta-lipo, en el suero normal no aparece la llamada fracción "0" compuesta principalmente por los quiloniocrones.

Mediante la electroforesis simple con papel y tampón de veronal pH = 8,6 obtenemos, si bien no de una manera constante, cuatro bandas: quiloniocrones, beta, prebeta y alfa-lipoproteínas. CHIN y BLANKENHORN utilizan las tiras de Sepharose III.

Entre los procedimientos de precipitación del método de COHN de fraccionamiento de plasma en medio alcohólico y a baja temperatura permite el aislamiento de la alfa-1-lipoproteínas en la fracción IV-1, 1 y de la beta-lipoproteínas en la fracción

III-0. Un método más perfeccionado se consigue combinando el procedimiento anterior con la ultracentrifugación-flotación de GOFMAN.

HURSTEIN y SAMAILLE (8) demostraron que la heparina y los heparinoides de síntesis en presencia de ciertos cationes bivalentes precipitan selectivamente las beta-lipoproteínas del suero.

Con la misma finalidad se ha empleado el sulfato de dextrano; sulfato de amilo combinando el gradiente de flotación y la precipitación por la FVP se separan los quilomicrones en dos clases: partículas primarias ambas de origen exógeno, las cuales a su vez quedan separadas de las partículas endógenas.

Finalmente, el método inmunológico utiliza anticuerpos específicos anti-alfa-lipoproteínas y anti-beta-lipoproteínas y mediante inmunoelectroforesis ó inmunodifusión se ha logrado caracterizar las dos principales lipoproteínas así como demostrar su ausencia ó su notable disminución en el suero. Recientemente, ha sido preparado un antígeno específico antipeptidos de VLDL.

Estructura y composición.

Las lipoproteínas no son entidades moleculares propiamente dichas. Se hallan constituidas por una fracción proteica y una fracción lipídica, aparte de un 3-5% de hidrocarbónados. Solo una minoría de lípidos se hallan unidos a la proteína en forma covalente, pues en su mayor parte la unión de ambas fracciones es de carácter no covalente.

En la actualidad los progresos en el conocimiento de las lipoproteínas circulantes se hallan orientados hacia la fracción proteica; sin embargo, aún no es posible clasificar cada lipoproteína según la naturaleza de la proteína contenida. Dicha fracción proteínica denominada apolipoproteína ó simplemente apoproteína (apo P) puede ser referida según los aminoácidos terminales de uno de los tres grupos siguientes: apo A (ácido aspártico), apo B (ácido glutámico) apo C (serina y treonina).

Un concepto que hay que tener presente es que al igual que en las proteínas del suero, cada clase de lipoproteínas no está formada por una colección homogénea de partículas, existiendo dentro de la misma entidad diferencias en cuanto a tamaño, densidad y composición química.

Según su estructura SCHUMAKER y ADAMS (9) admiten dos tipos básicos de lipoproteínas pseudomoleculares. Ambos tipos estructurales representan dos soluciones diferentes al problema de como los lípidos pueden ser transportados a través de un medio acuoso; de estos lípidos, los ácidos grasos libres y los fosfolípidos, Lecitina y esfingomielina, poseen carácter hidrófilo en tanto que los triglicéridos y los ésteres de colesterol son hidrófobos. Otros lípidos como el colesterol, lisolecitina y otros fosfolípidos, mono y diglicéridos no tienen un carácter hidrófilo ó hidrófobo tan definido.

A) Lipoproteínas micelares: Contienen menos de un 30% de proteínas y se hallan representadas por los quilomicrones, beta-lipo. (LDL) y pre-beta-lipo. (VLDL).

Estructuralmente se hallan formadas por un núcleo hidrófobo de triglicéridos y ésteres de colesterol rodeado por una cubierta hidrófila de proteínas, fosfolípidos y colesterol libre.

Hasta hace poco no ha sido posible obtener la apo P de estas lipoproteínas en forma hidrosoluble y deslipidizada. La extracción parcial-n-heptano de las VLDL (pre-beta) proporciona tres componentes cuyos coeficientes de sedimentación son: 45, 75 y 145. El análisis de los aminoácidos terminales identifica la fracción 45 como apo A; la 145 consta principalmente por ácido glutámico como apo-B y la 75 que contiene serina y treonina en proporción molar 1:2 como apo-C.

Para la beta-lipoproteína (LDL) no existe unanimidad de criterio y en general se admite la presencia de apo-B y apo-C. Comparativamente, la VDL de menor densidad se sitúa en el electroferograma por delante de la beta-lipoproteína hecho que se explica por la presencia en la primera de apo-A, característica de la composición de la alfa-lipoproteína.

Por microscopía electrónica tanto los quilomicrones como las VLDL y las LDL aparecen como partículas esféricas ó como tendencia a la esfericidad. Se puede representar la lipoproteína micelar como una esfera cuya superficie estaría constituida por la proteína extendida como un mosaico y en interdependencia con un complejo fosfolípido-colesterol. El lado polar de esta superficie se hallaría orientado hacia el medio acuoso que la rodea, mientras que el extremo no polar estaría en íntima relación con el núcleo hidrófobo de la partícula constituido principalmente por triglicéridos y ésteres de colesterol.

#### Quilomicrones.

Con el nombre de quilomicrones se designan las partículas visibles al microscopio que aparecen en la sangre y linfa en condiciones normales después de la ingesta de una comida que contenga neutra y durante el periodo después de la absorción. Después de 12 horas de ayuno, normalmente, no se hallan quilomicrones en el plasma. Los quilomicrones desaparecen rápidamente del plasma, cuando los quilomicrones contienen glicéridos marcados se comprueba cómo en el plazo de cinco a quince minutos de detección. De un diámetro medio entre 0,5 y 5, los quilomicrones del suero suelen tener aproximadamente 1 de diámetro.

Durante la digestión intestinal los triglicéridos de las grasas ingeridas son hidrolizados principalmente en ácidos grasos y monoglicéridos. Después de su absorción se resintetizan los triglicéridos a partir de los ácidos grasos de larga cadena mientras que los ácidos de cadena corta alcanzan el hígado directamente por el sistema venoso de la porta. La hidrólisis de los glicéridos, convenientemente

dispersos por la acción de la bilis, se debe a la acción de la lipasa, los triglicéridos resintetizados se adicionan de colesterol, fosfolípidos y probablemente de proteínas.

Por lo que se refiere a los fosfolípidos y concretamente a la lecitina ésta se previamente hidrolizada a lisolecitina, de mayor solubilidad, forma en que es absorbida para luego ser reesterificada a lecitina antes de su incorporación a los quilomicrones. En cuanto al colesterol contenido en los quilomicrones posee un doble origen, exógeno y endógeno. La mayor parte de colesterol exógeno se incorpora esterificado en oposición al colesterol endógeno que lo hace libre. En ayunas, la linfa humana solo apo-A y apo-B, después de una comida aparecen apo-C juntamente con el aumento de triglicéridos.

La composición aproximada de los quilomicrones es la siguiente: colesterol 2-5% fosfolípidos 6-10% (relación colesterol/fosfolípidos = 0,5), triglicéridos 80-90% fracción proteina 0,5-2,5%.

Los quilomicrones constituyen las lipoproteínas de menor densidad (inferior a 0,95) con una constante de sedimentación Sf 400 y el mayor peso molecular, aproximadamente de  $10^3 - 10^4$  (millones).

Los quilomicrones representan el medio de transporte más importante de los triglicéridos exógenos, que son llevados al hígado, tejido adiposo, músculos y R.R. La rápida desaparición de los quilomicrones y tularares se debe a la acción de enzimas diversos en especial la lipasa lipoproteínica (Lpasa) y la lecitina colesterol-aciltransferasa (LCAT), de las cuales nos ocuparemos más adelante.

La transformación enzimática de los quilomicrones y su desaparición como tales del plasma circulante se denomina "aclaramiento".

Cuando la proporción de quilomicrones es muy baja ó faltan como ocurre normalmente en el sujeto en ayunas no aparecen en el diagrama electroforético. La presencia de quilomicrones se revela por una banda muy teñida que se extiende desde el punto de la impronta hasta las zonas de la beta-lipoproteína. La extensión y la intensidad de la banda de quilomicrones está relacionada con el contenido de triglicéridos exógenos.

#### Beta-lipoproteínas.

Conocidas también por proteínas de baja densidad (LDL) ó también por beta-lipoproteínas pesadas en oposición a las beta-lipoproteínas ligeras (ó prebeta) se identifican en el electroferograma sobre papel ó acetato de celulosa como una banda bien delimitada de la zona beta.

Poseen un 50% de colesterol del cual constituye el medio más importante de transporte; 24% de fosfolípidos siendo la relación colesterol/fosfolípidos de 2,5% de triglicéridos y 20% de fracción proteínica.

62

Su densidad es de 1006-1062, siendo su peso molecular aproximado de 2 a 3 millones y su constante de flotación Sf = 0-20. La beta apo-P, porción peptídica de la beta-lipoproteína es esencial para el transporte de los glicéridos tanto exógenos como endógenos, de tal que su ausencia (abeta-lipoproteinemia) condiciona la falta de quilomicrones y de prebeta-lipoproteínas.

#### Pre-beta-lipoproteínas.

Las lipoproteínas beta de muy baja densidad (VLDL) se sitúan en el electroferograma por delante de la fracción beta y a nivel de las globulinas alfa<sub>2</sub>.

Las prebeta-lipoproteínas poseen un contenido proteínico de un 6-12%, colesterol 20%, fosfolípidos 18-20%, reacción colesterol (fosfolípidos = 1-1, 2, y 50-70% de triglicéridos.

Su baja densidad de 0,95 a 1006, con un coeficiente de flotación entre 20-400, contrasta con su elevado peso molecular de 5 a 100 millones.

Como vimos anteriormente entre las apoproteínas de las VLDL aparte de las B y C se halla la apoproteína A característica de la alfa-lipoproteína y cuya mayor movilidad electroforética explica su situación por delante de la beta-lipoproteína.

La composición de los ácidos grasos de los glicéridos de las lipoproteínas prebeta, registra una mayor riqueza de oleico y palmítico que de ácido linoleico, forma la análoga a la de los glicéridos sintetizados endógenamente. Existe la evidencia de que el hígado es el lugar más importante de la síntesis de los triglicéridos endógenos y en un plano secundario los carotenos, también el hígado es el lugar principal de todas o la mayor parte de las prebeta-lipoproteínas circulantes.

Corresponde principalmente a las prebeta-lipoproteínas el trasiego de los glicéridos endógenos y los carotenos, ésteres de colesterol de la vitamina A y la estrona.

**B) Lipoproteínas pseudomoleculares.** Se hallan representadas por las lipoproteínas de mayor densidad del espectro o alfa-lipoproteínas.

#### Alfa-lipoproteínas.

Son lipoproteínas de alta densidad o muy alta densidad (HDL o VHDL) con una gama de densidades que van desde 1063 a 1,21. Las HDL se subdividen en HDL<sub>2</sub> (1063-1025 g/c.c.) y HDL<sub>3</sub> (1025-1,21 g/c.c.). Las VHDL son complejos lipoproteínicos de densidad superior a 1,21 g/c.c.

El examen con luz polarizada asigna a las alfa-lipoproteínas una forma elíptica con diámetros de 300x50 Å<sup>2</sup>. Por lo que se refiere a su estructura se cree que se hallan compuestos por subunidades de proteína-lípidos, en cada subunidad, el lípido se hallaría alojado en los intersticios de los pliegues de la cadena peptídica.

El contenido proteico es muy elevado, 50% siendo el de colesterol de 20%, el de fosfolípidos de 27% y de un 5% los triglicéridos; la relación colesterol/fosfolípidos es de 0,6-0,8. El fosfolípido más importante es la lisolecitina. La alfa-lipoproteína posee más colesterol esterificado y fosfátidos que la beta-lipoproteína.

En cambio la composición de ácidos grasos es similar en ambas lipoproteínas. La alfa-lipoproteína no es precipitada por el dextrano, heparina, heparinoides o síntesis, etc. quedando en el sobrenadante mientras que las lipoproteínas de baja densidad son arrastradas al fondo.

Es relativamente estable, mediante solventes adecuados se obtiene su deslipidización, quedando la apo-A hidrosoluble, bastante pura y solo con una pequeña fracción de fosfátidos.

Con la técnica de GOTTAN de ultracentrifugación-flotación es preciso enriquecer el medio con NaCl hasta una densidad de 1,21 g/c.c. (26°C) siendo en estas condiciones la constante de flotación  $F_{1,21} 0-9$ . Todavía se halla en discusión si las lipoproteínas VLDL es decir las de mayor densidad, (1,21) constituyen una entidad fisiológica o son meros artefactos. Existe un hecho cierto y es que la centrifugación prolongada aumenta la cantidad de VLDL obtenida.

Las alfa-lipoproteínas son menos antigénicas que las beta-lipoproteínas, más ricas en lípidos.

La influencia del sexo en la concentración relativa de alfa y beta lipoproteínas se traduce por una mayor cantidad de lipoproteínas. La hiperestrogenemia suele determinar un notable aumento de lipoproteína, en ocasiones acompañado de un aumento de colesterol.

#### Hodinámica de las lipoproteínas circulantes.

En el metabolismo de las lipoproteínas juega un importante papel dos enzimas, lipasa lipoproteínica (lipasa) y la lecitín-colesterol acil transferasa (LCAT).

Lipasa lipoproteínica: El plasma post-heparina así como el extracto acetónico de diversos tejidos poseen la propiedad de la lipasa. El mejor sustrato lo constituyen los triglicéridos integrados en las lipoproteínas, habiéndose demostrado que la presencia de proteína es necesaria para facilitar la hidrólisis. La protamina inhibe la acción enzimática de la lipasa. En condiciones normales, la lipasa es liberada de los tejidos y pared de los vasos capilares a la circulación por la acción de la heparina y de otros agentes activados así como por la ingesta de comidas grasas.

Es bien conocida la acción de "aclaramiento" del plasma al ser hidrolizados los triglicéridos. Mientras los triglicéridos de los quilomicrones tienen una duración de unos 15 min., es algo mayor en los de la prebeta-lipoproteína.

La disminución patológica de la actividad de la lipasa o bien la producción de una lipasa alterada condiciona una falta de aclaramiento del plasma al no ser hidrolizados los triglicéridos, tal ocurre en la hiperquilomicronemia familiar. (Tipo I de hiperlipemias según FREDRICKSON) de la que nos ocuparemos más adelante. Este defecto del metabolismo de las lipoproteínas acarrea un depósito anormal de lípidos en los tejidos.

Lecitin-colesterol-aciltransferasa. El suero ó plasma posee una enzima que cataliza la transferencia del grupo acil en posición 2 de la lecitina al hidroxilo del colesterol dando como productos finales lisolecitina y ésteres de colesterol.



De conocimiento más reciente la actividad de esta enzima es de suma importancia en la formación de ésteres de colesterol. En oposición a la lipasa se encuentra normalmente en el plasma circulante; probablemente vinculada a la alfa lipoproteína, si bien en los tejidos también se lo encuentra aunque en menor concentración. Este enzima es inhibido por diversos agentes entre ellos el bromuro sódico.

El déficit de LCAT da lugar a un trastorno metabólico de las lipoproteínas recientemente descubierto en Noruega por NORUM y GJEBLE (10) en tres hermanas. Posteriormente este error congénito ha sido observado en otras familias. El síndrome bioquímico se caracteriza por hipertrigliceridemia y ausencia total de colesterol esterificado. Aumento de la lecitina con disminución de lisolecitina. En ocasiones se observa un marcado aumento del colesterol, así como de los fosfolípidos. El electroferograma demuestra la reducción notable de la alfa-lipoproteína y la ausencia de prebeta-lipoproteína.

En una enfermedad se le transfundieron 800 c.c. de plasma normal observándose en el plazo de 4 días el aumento de un 9-30% de los ésteres de colesterol, aumento que no se puede imputar al plasma transfundido y solo a la LCAT inyectada.

Clinicamente se traduce por anemia y proteinuria. Anemia normocromica con dianocitos, aumento de la hemólisis y depresión de la hematopoyesis. Los hematocitos con dianocitos presentan aumento de colesterol. Si bien la cantidad de fosfolípidos es normal, la proporción de lecitina se halla aumentada mientras que la de cefalina y esfingomielina está reducida. Estas modificaciones en la composición de los lípidos se normalizan cuando los hematocitos se incuban en suero normal.

En la médula ósea y en el riñón se observa la presencia de células espumosas.

Metabolismo de las lipoproteínas.—Los quilomicrones formados en el intestino sirven para el transporte de los glicéridos exógenos y su utilización y almacenamiento en los tejidos.

Las VLDL (prebeta) se sintetizan en el hígado como respuesta al exceso de dieta hidrocarbonada ó al exceso de ácidos grasos movilizados del tejido adiposo, sirviendo como principal vehículo de los triglicéridos endógenos.

Las beta-lipoproteínas (LDL) se sintetizan en el hígado y son el medio de transporte más importante del colesterol.

Las alfa-lipoproteínas (HDL) son sintetizadas en el hígado. Facilitan la apoptosis a los quilomicrones y VLDL, una vez irrumpen en la circulación.

Tanto la lipasa como la LCAT se benefician del ingreso del apo-A en las partículas lipídicas. La lipasa al actuar sobre los quilomicrones y las VLDL hidrolizando los triglicéridos, determina una reducción de su volumen. Al propio tiempo la LCAT al ejercer su acción catalítica sobre las unidades de lecitina y colesterol libre (1:1) determina la reducción de la superficie. Como resultado de esta doble acción conjunta las micelas lipoproteínicas guardan su forma esférica mientras van reduciendo su volumen.

En cuanto a los productos finales de la actividad enzimática, los ácidos grasos liberados se unen a la albúmina la cual sirve de vehículo para su transporte. La lisolecitina es muy soluble en el medio acuoso y eventualmente se une a la albúmina ó a las VLDL. Los ésteres de colesterol formados por la LCAT, como lípidos neutros, penetran en el interior hidrofobo de las VLDL desplazando los triglicéridos ó bien se une a otra lipoproteína como la alfa-lipoproteína.

Un aspecto interesante de la biodinámica de las lipoproteínas es su interconversión. Ya de un principio se pensó en la formación de alfa y beta lipoproteínas a expensas de los quilomicrones y VLDL. Se ha demostrado que existe una relación recíproca entre la concentración de VLDL y las lipoproteínas alfa y beta. Los estudios con productos marcados demuestran como durante el catabolismo de los quilomicrones se liberan alfa-lipoproteínas, así mismo "in vitro" se ha comprobado que cuando se incuba VLDL con lipasa se forma beta-lipoproteína de características análogas a la que se encuentra en el suero.

La vida media de las alfa y beta-lipoproteínas es de unos 4-3 días. Este tiempo se alarga en el hipotiroidismo, que se acorta en el hipertiroidismo, hepatitis y en la hiperlipemia familiar (tipo I de Fredrickson).

Existen razones fundadas para suponer que las beta-lipoproteínas que transportan grandes cantidades de colesterol esterificado sean catabolizadas, en condiciones normales, por las células de SRE, por un mecanismo de pinocitosis. La esterificación del colesterol como anteriormente hemos señalado, corre a cargo de la LCAT, los depósitos de colesterol esterificado que se producen en los tejidos en el enfermedad de Tangier (falta de alfa-lipoproteína) son ocasionados por esta enzima en tanto que la enfermedad congénita con falta de LCAT apenas se hallan ésteres de colesterol dándose la contingencia de que en ambos procesos está muy reducida ó falta la alfa-lipoproteína coexistiendo con valores normales ó elevados de beta-lipoproteína.

Hay que subrayar la importancia de la apo-A en el desarrollo de las actividades enzimáticas de la lipasa y LCAT. Tanto los quilomicrones como las VLDL toman la apo-A circulante la cual es inmunológicamente similar a la de alfa-lipoproteína. La diferente movilidad electroforética depende de la cantidad de apo-A que ha sido integrada. En el déficit congénito de apo-A se produce un cambio en la movi-

lidad electroforética de las VLDL ó prebeta-lipoproteínas observándose en su lugar una amplia banda de beta-lipoproteínas a pesar de que el suero de tales pacientes es rico en lipoproteínas VLDL, lo cual viene a corroborar que la movilidad electroforética prueba está relacionada con la presencia de apo-A en estas lipoproteínas. La presencia de apo-A en los quilomicrones y VLDL activa la lipasa y la LCAT y en consecuencia el poder clarificante del suero; tanto es así que en el déficit de alfa-lipoproteínas se encuentran a menudo niveles de triglicéridos. Al parecer no existen diferencias fundamentales en la forma de actuar de las enzimas lipasa y LCAT sobre los glicéridos de los quilomicrones y de las VLDL a pesar de su diferente procedencia, exógena ó endógena, respectivamente.

En la hiperlipemia inducida por hidratos de carbono ó endógenos el aumento máximo de triglicéridos ocurre entre los tres y diez días, para luego desaparecer paulatinamente a pesar de continuar la dieta hidrocarbonada. Dicho aumento refleja la limitada actividad enzimática para hidrolizar los triglicéridos, así como de la capacidad de adaptar los mecanismos de su producción con la sobrecarga de hidratos de carbono.

Finalmente, señalemos la importancia de las relaciones entre lipoproteínas y membranas celulares. Entre hematies y lipoproteínas se establecen interacciones de fosfolípidos, siendo de los más importantes los de la lecitina y esfingomielina, provenientes de las alfa y beta-lipoproteínas. Las prebeta-lipoproteínas interaccionan principalmente lisolecitina. Se admite que la lisolecitina incorporada al hematie es esterificada a lecitina, renovando de esta forma las moléculas oxidadas, lo cual viene a demostrar la importancia de las lipoproteínas en el mantenimiento del estado funcional de la membrana de hematie. en las enfermedades de déficit de lipoproteínas ó de los fermentos que intervienen en la biodinámica, se observan anomalías globulares debidas precisamente a las alteraciones de su metabolismo lipídico. En el déficit de alfa-lipoproteína, los hematies contienen más lecitina y menos esfingomielina ocurriendo lo contrario en la abetalipoproteinemia.

Es característico el aspecto dentado de los hematies (acantocitosis) que se presenta en la abeta-lipoproteinemia (véase más adelante). Recientemente R.A. COOPER (22) (Harvard Med. School) ha señalado el fenómeno de la acantocitosis en tres enfermos con hepatopatía alcohólica, grave; los hematies poseían un elevado contenido de colesterol comprobándose su depósito y localización en la membrana globular. La incubación de los hematies en suero normal perdiendo su exceso de colesterol, viceversa, la incubación de hematies normales en suero de los enfermos, determinaba la aparición de acantocitos juntamente con un aumento del contenido globular en colesterol. En el suero de los enfermos se comprobó la ausencia ó déficit en LCAT.

Después de enviada la extensa literatura, dentro de las semiología funcional plaquetaria, escogimos las técnicas de adhesividad de Breddin, agregación fotoométrica de Born y el estudio completo de lípidos por métodos químicos y por cromatografía en capa fina.

En la clínica podíamos estudiar dentro del extenso campo de enf. vasculares y su complicación más frecuente las trombosis muchos campos. Hemos escogido enfermos no agudos, por varias razones: a) podíamos estudiarles sin tratamiento que alterara los métodos, b) las condiciones de trombosis agudas, han sido ampliamente estudiadas y creemos hay factores de estudio y de tratamiento que modifican estas pruebas.

El estudio de esta semiología plaquetaria en los enfermos arterioscleróticos, diabéticos, tratamientos con anovulatorios....etc. pretendía los siguientes objetivos:

- 1.- Introducción y valoración de estas técnicas en nuestro laboratorio.
- 2.- Diferencias entre normales y grupos patológicos de enfermos en los que en su clínica estadísticamente son frecuentes las trombosis.
- 3.- Posibles relaciones lípidos séricos y pruebas funcionales plaquetarias.
- 4.- ¿Los anovulatorios modifican las pruebas funcionales plaquetarias y los lípidos séricos?.
- 5.- ¿Pueden considerarse estas pruebas como índice de hipercoagulabilidad y se puede presumir la instalación de trombosis en enfermos con estas pruebas alteradas?.
- 6.- Añadir pruebas funcionales ó mayor expresividad a estas técnicas.

PARTE EXPERIMENTAL

I.- METODOS Y TECNICAS.

A) Adhesividad plaquetaria.

El estudio de la adhesividad lo hemos realizado siguiendo la técnica de Bred-din. Esta técnica es simple y consiste en el conteje del número de plaquetas por mm<sup>2</sup> que se han adherido al fondo de una cámara siliconada.

Método:

La extracción de la sangre ha de hacerse con aguja y jeringa siliconada ó mejor como hemos hecho nosotros, despreciar las primeras gotas y que caiga direc-tamente de la aguja a un tubo siliconado con citrato al 3,8% (1/9).

La obtención del PRP la hemos realizado por centrifugación a 1500 r.p.m. du-rante 3 a 5 minutos. Se efectúa el conteje de plaquetas.

Con una pipeta se obtiene PRP y se colocan en dos cámaras siliconadas, una gota en cada parte de las cámaras de conteje. Se coloca el cubreobjetos.

Durante 10 minutos se dejan reposar las cámaras sobre una superficie plana. Inmediatamente se retira el cubre y se introducen las cámaras en cubetas de la-vado que contienen 9 partes de suero fisiológico y 1 parte de citrato sódico al 3,8%: se efectúan 10 pases de lavado.

Después se ponen en cubeta para la fijación, cubriéndose la superficie por formaldeido al 40%, realizado con pipeta durante cinco minutos.

Más tarde se vierte el formol y se lavan 1 ó 2 veces, en agua destilada.

Las cámaras están listas para efectuar el conteje.

El índice de adhesividad viene dado por la relación:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de plaquetas adheridas por mm}^2 \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ " " " " en PRP}}$$

Material:

1. Cámara de Neubauer. (fig. 1)
2. Formol al 40%.
3. Citrato sódico al 3,8%.

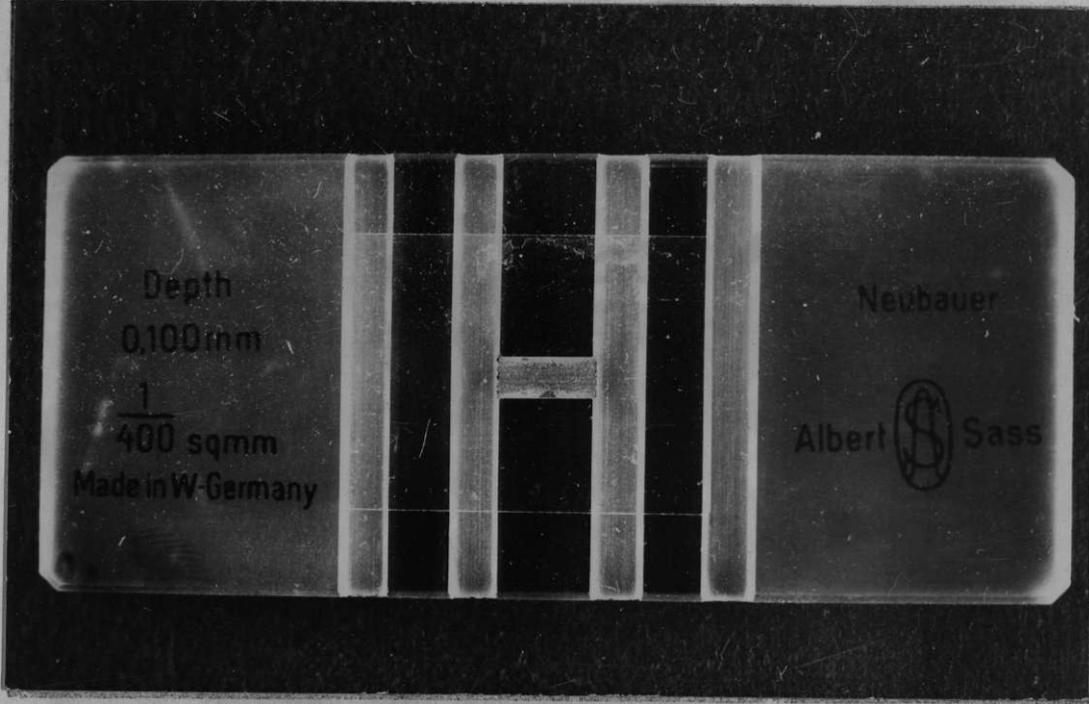


Figura 1.-

B) Agregación plaquetaria.

Hemos empleado el método fotométrico de Bohn, en el que se miden las variaciones de densidad óptica del TRP al que se somete agitación continua y a la acción de sustancias agregantes y desagregantes.

Material:

1. Agregómetro, suministrado por el Profesor Bron y construido manualmente. Lleva adjuntado un baño a 37° en conexión con el agregómetro que permite efectuar las determinaciones a temperatura constante (fig. 2).

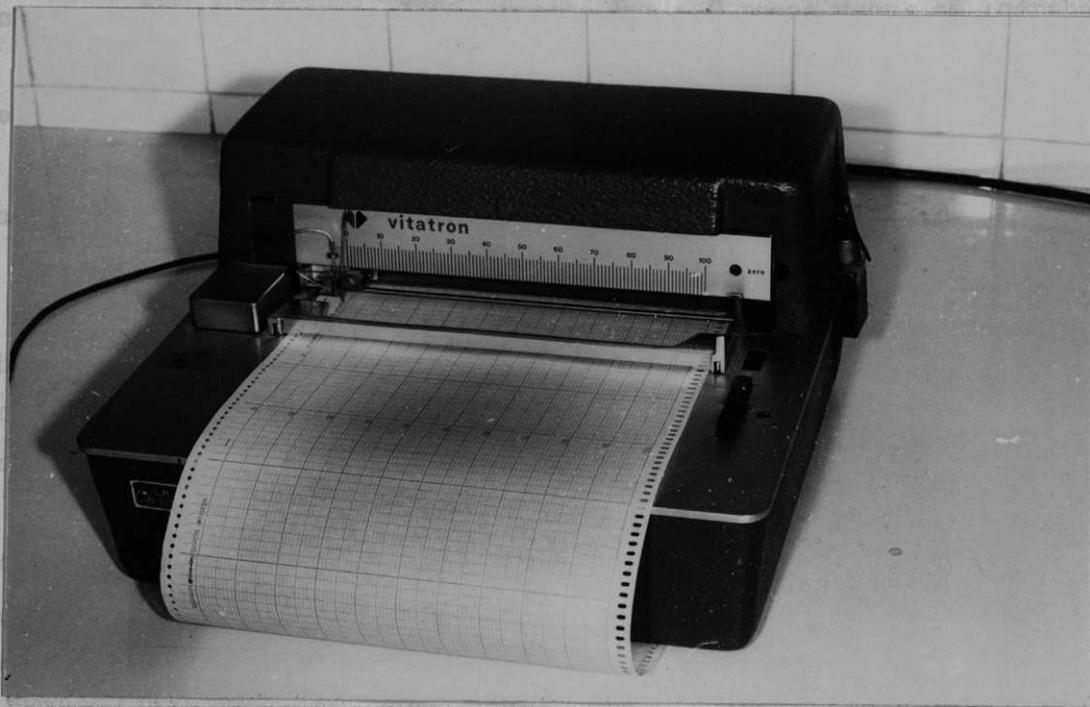


Con este aparato se dispone de un mando para poner en marcha un mecanismo magnético que agita un pequeño cilindro de hierro recubierto de plástico que añadimos a cada tubo; este agitador, se mantuvo constante a 500 r.p.m. y además nos ha servido de guía para obtener el punto correcto de iniciación de la agregación.

2. Vitatron 400. Aparato que asociamos al agregómetro para obtener un registro automático sobre papel a escala lineal con variaciones del 0 al 100% de densidad óptica. (Fig. 3).

3. Tubos de vidrio siliconados de 0,8 x 3 cm.

4. Baño a 37° en el que se mantenían los tubos con PRP y dipiridamol incubándose durante media hora.



#### Reactivos:

a) Plasma rico en plaquetas (PRP): preparado por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 3 a 5 minutos de sangre entera, recogida en tubos de plástico incoagulable por adición de citrato sódico al 3,8% (1/9). Se efectúa un conteo de plaquetas limitando los valores entre 200.000 y 300.000/mm<sup>3</sup> mediante adición de plasma autólogo ó discreta centrifugación.

b) Plasma pobre en plaquetas (PPP): obtenido por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos de sangre entera dando conteos inferiores a 10.000/mm<sup>3</sup>.

c) Tampón de Michaelis: a pH 7,3.

d) ADP (Boehringer): Preparábamos una solución madre a 80 micromoles, que se

congelaban a 20°C. Se realizaban diferentes diluciones; para nuestro trabajo hemos utilizado fundamentalmente las de 1,25 y 0,62 micromoles que se hacían en el momento de la prueba y se conservaban entre hielo hasta el instante de su adición al PRP.

e) Dipiridamol (Boehringer): a la concentración de 5 microgramos/ml.

Técnica:

Una vez preparados los reactivos y con la precaución de poner el baño asociado al agregómetro y su conexión es media hora antes en funcionamiento, procedíamos a:

1. ajuste del agregómetro: en un tubo se colocaban 0,8 ml. de PRP y 0,4 ml. de tampón de Michaelis, procurando que el indicador de la gráfica del Vitratón estuviese lo más cercano al 5%, puesto que a 0 pocas veces se lograba.

En un segundo tubo se ponían 0,8 ml. de PRP y 0,4 de tampón de Michaelis y se ajustaba al 100% cosa que casi siempre era posible.

Este ajuste conviene repetirlo varias veces hasta que se vea la fijeza de los valores.

2. Agregación con ADP: se ponen 0,8 ml. de PRP, 0,2 de tampón de Michaelis y 0,2 de ADP a las dos concentraciones, 1,25 y 0,62 micromoles. Se pone en marcha el gráfico automático a velocidad (5 del aparato) de 2 cm./sg., entonces se pone en marcha el agitador al mismo tiempo del vitratón obteniéndose las curvas de agregación.

3. Como substancia inhibidora de la agregación utilizamos dipiridamol. Media hora antes procedíamos a la incubación de 0,8 ml. de PRP y 0,2 ml. de dipiridamol equivalentes a 5 microgramos. Después se añadía ADP en las dos concentraciones antedichas y se obtenían los registros gráficos.

VALORACION DE LA AGREGACION.

Con los actuales agregómetros medimos variaciones de densidad óptica ó de transmisión óptica de PRP y las diferentes substancias agregantes ó desagregantes añadidas.

Las relaciones densidad óptica y agregación plaquetaria no están claras. Unos consideran que hay una relación lineal y para otros es logarítmica.

Nosotros hemos utilizado en nuestros experimentos el supuesto de relación lineal y nos enfrentamos con las diferentes gráficas de agregación y un sin fin de métodos de valoración, los cuales ni están standartizados ni son modélicos.

Aconsejados del Profesor J. Riverola y después de revisar detenidamente los métodos hasta ahora empleados, nos dimos cuenta que las curvas podrían ser valoradas como curvas logísticas.

Una vez decidido el tratarlas como logísticas, obtuvimos una serie de parámetros dentro de los convencionales de estas curvas que nos sirviera para los datos que queríamos hallar y además teniendo en cuenta que la obtención fuera fácil.

Obtuvimos cinco datos de cada curva de la siguiente forma:

Se trazan dos tangentes paralelas en los puntos de máxima inflexión de las gráficas y agregación. Uniendo dichos puntos se obtiene una línea la cual corta la curva en un solo punto, denominado punto de inflexión; se traza una línea horizontal por dicho punto. Se mide la distancia entre las dos paralelas antedichas y por fin se trazan una secante al punto de inflexión y desde ella una perpendicular hasta la horizontal que pasa por el punto de inflexión a una distancia de 1/4 de segundo. (Ver gráfica 1 y 2).

Los datos que resultan de estos cálculos, son los siguientes:

Alfa : distancia desde el inicio de la agregación hasta el punto de inflexión.

A : corresponde al doble de la distancia entre la horizontal que pasa por el punto de inflexión y el máximo de la curva.

Beta : es 4 veces el valor del cuádruplo de la distancia entre ambas tangentes paralelas.

C : Es la diferencia entre el máximo de curva y A.

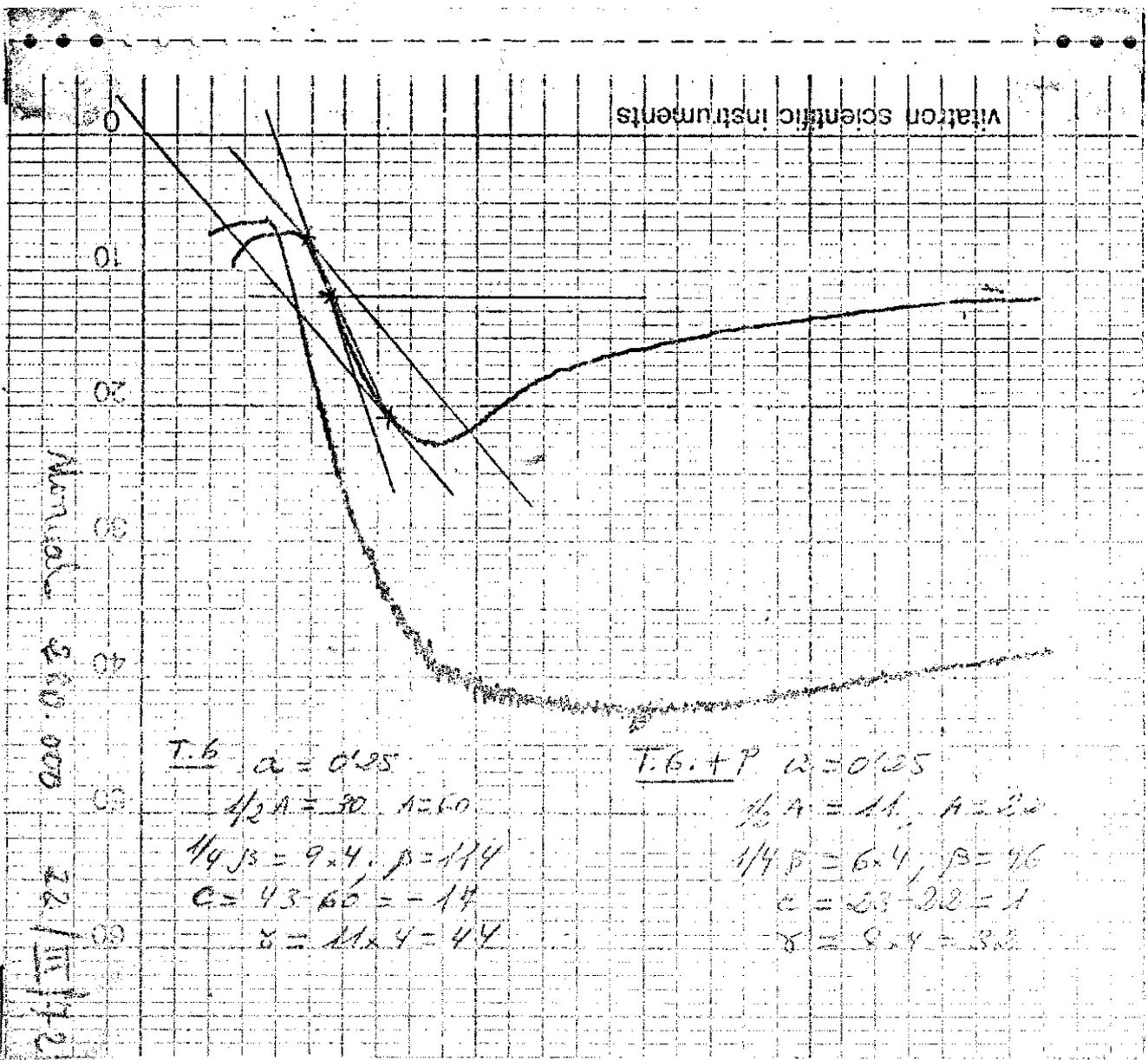
Gamma : es la pendiente de la curva y equivale al cuádruplo de la perpendicular entre la secante al punto de inflexión y la horizontal hasta este mismo punto.

Estos datos estadísticos referidos a la agregación significan:

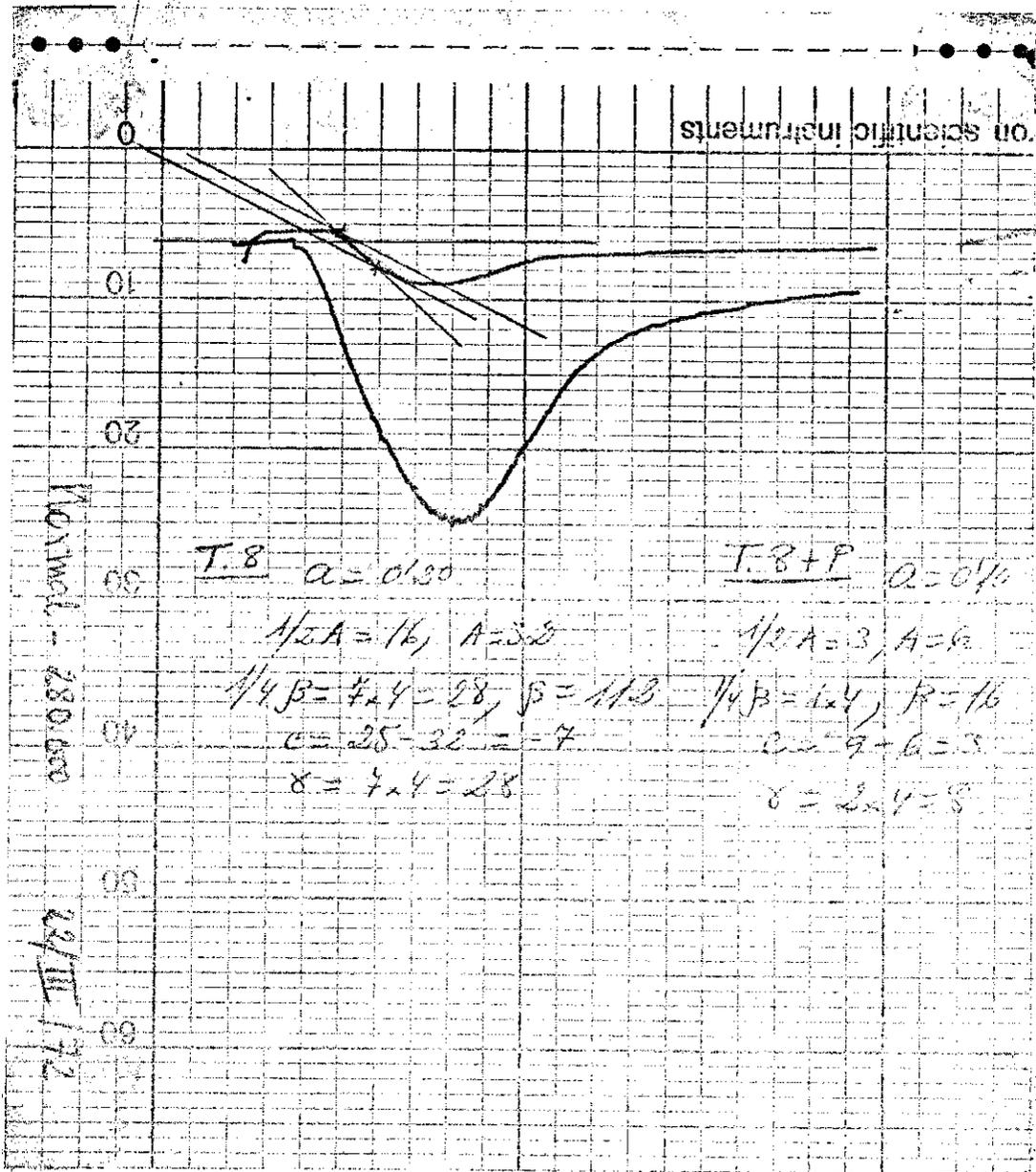
alfa: tiempo de obtención del punto de máxima inflexión.

A: agregación máxima obtenida.

Beta: valor que implica la velocidad máxima de agregación y el máximo de agregación, y que significa el nivel de agregación al que se obtiene la velocidad



Graph 1.-

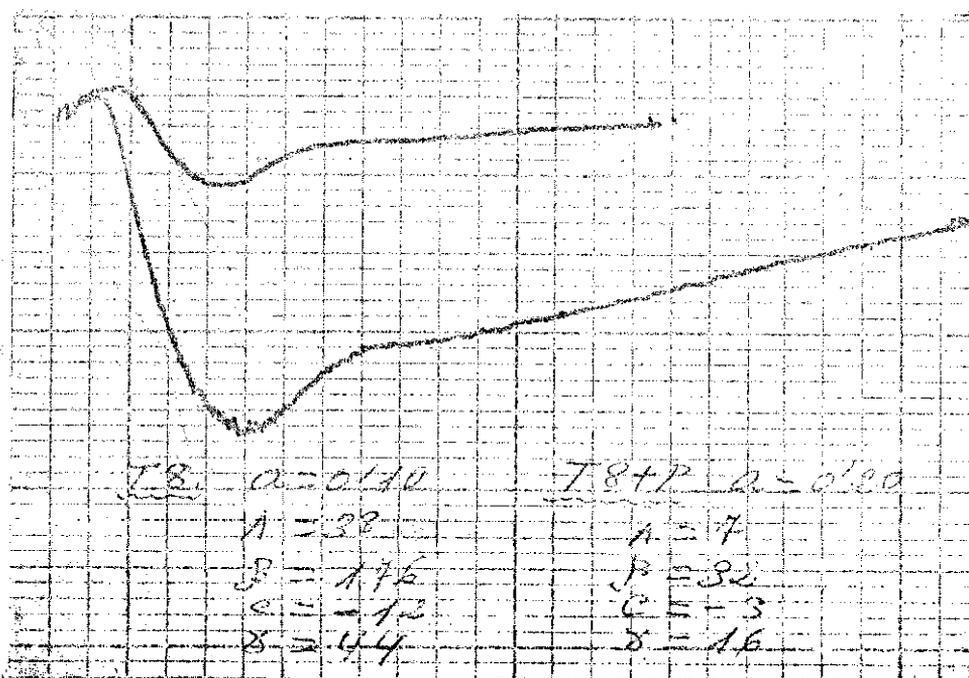
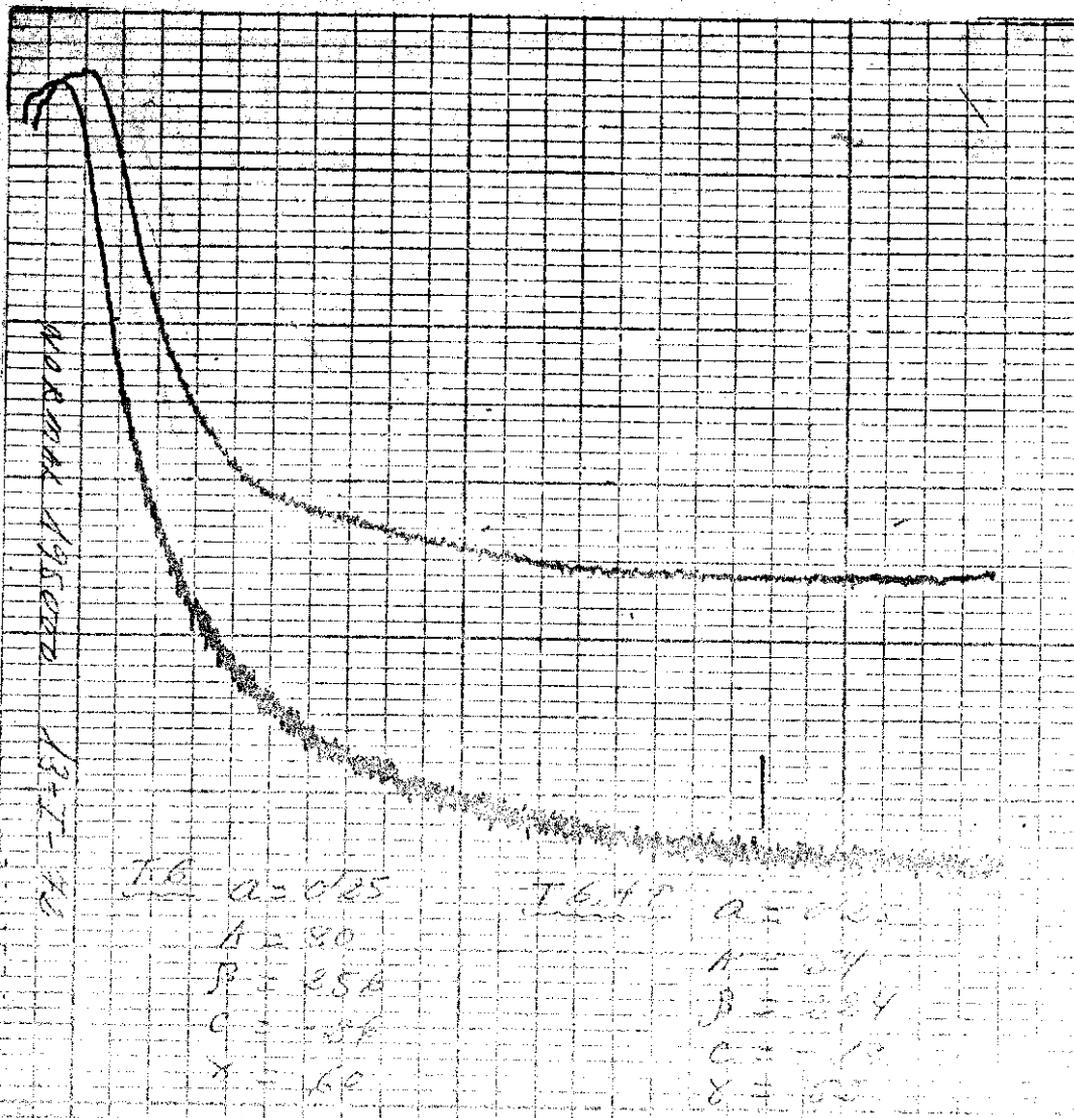


Gráfica 2.-

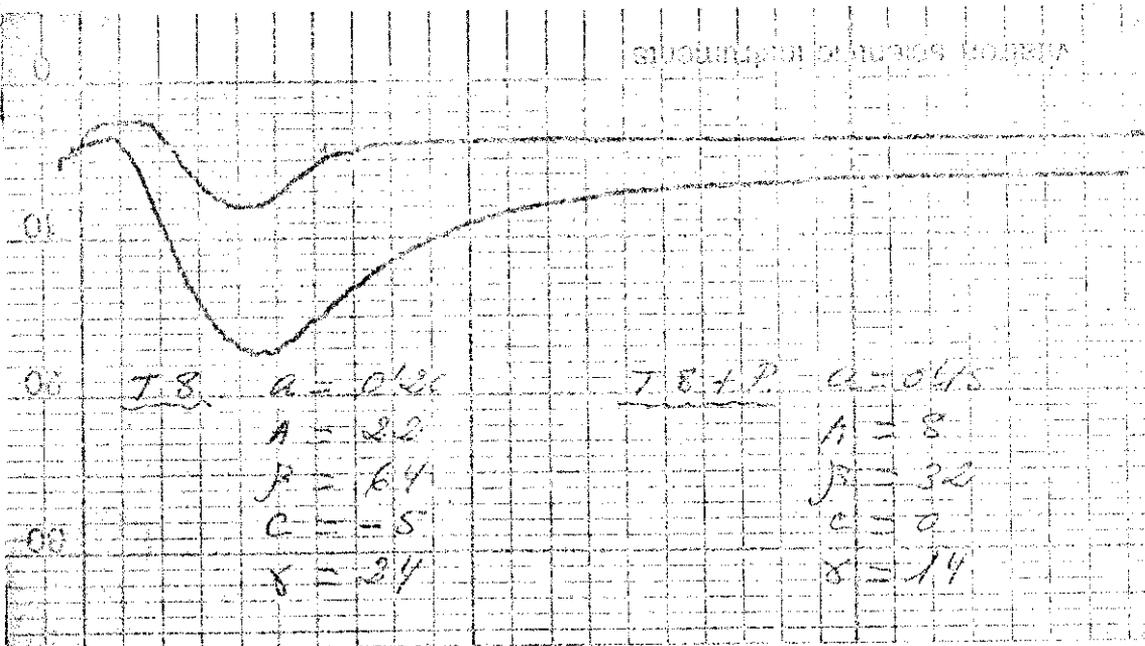
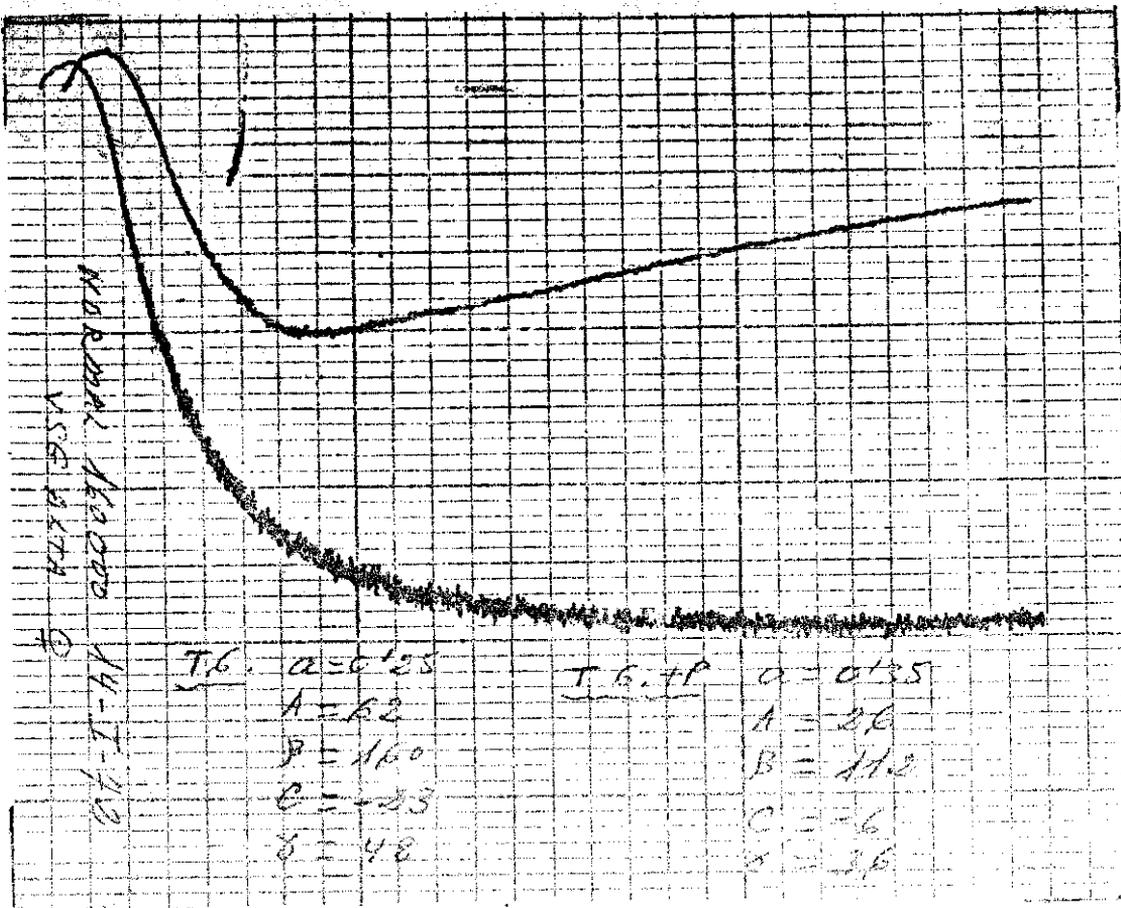
máxima.

$G$ : es el "estado de agregación" de las plaquetas anterior a añadir las sustancias agregantes.

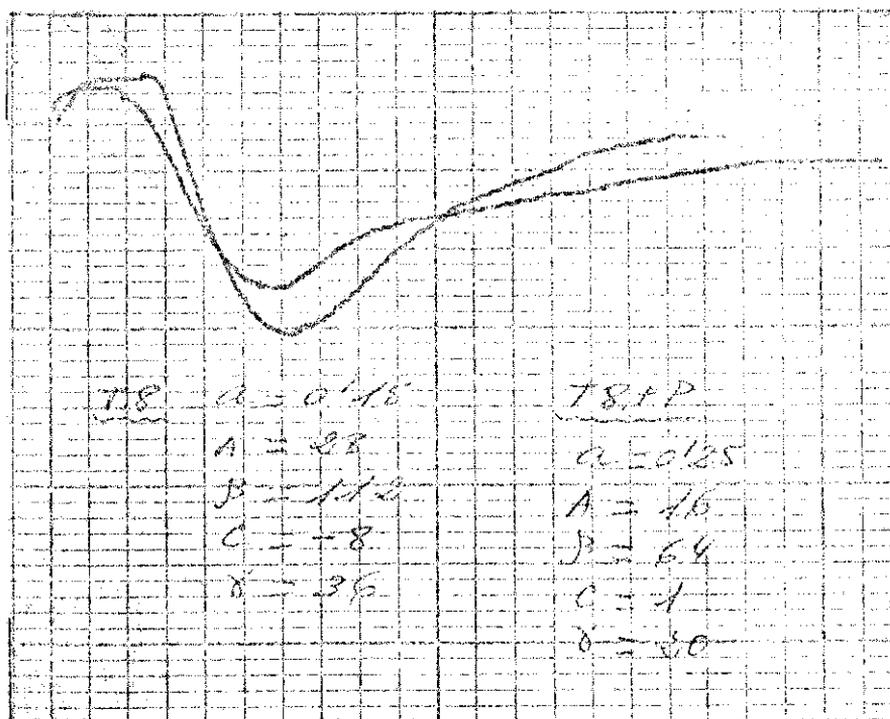
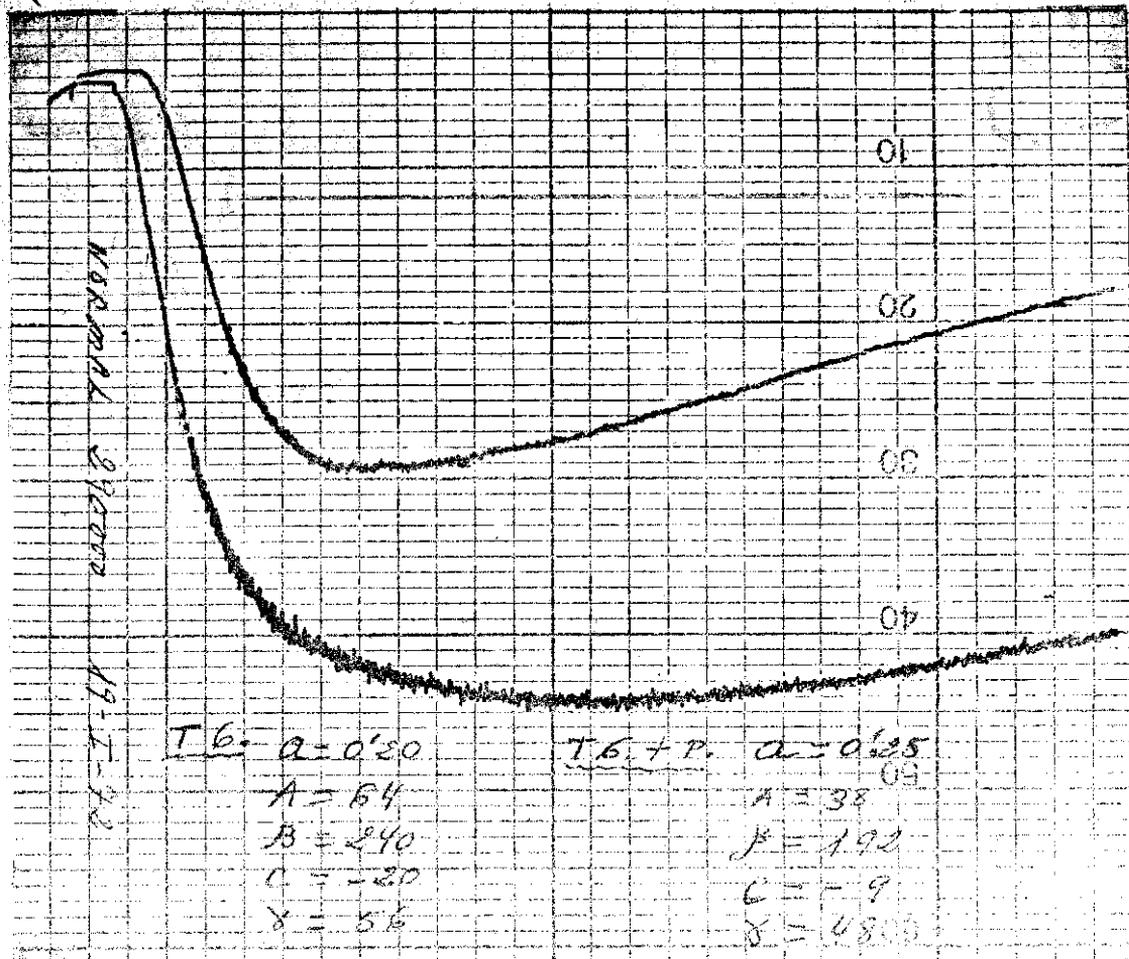
Gamma: velocidad máxima de agregación.



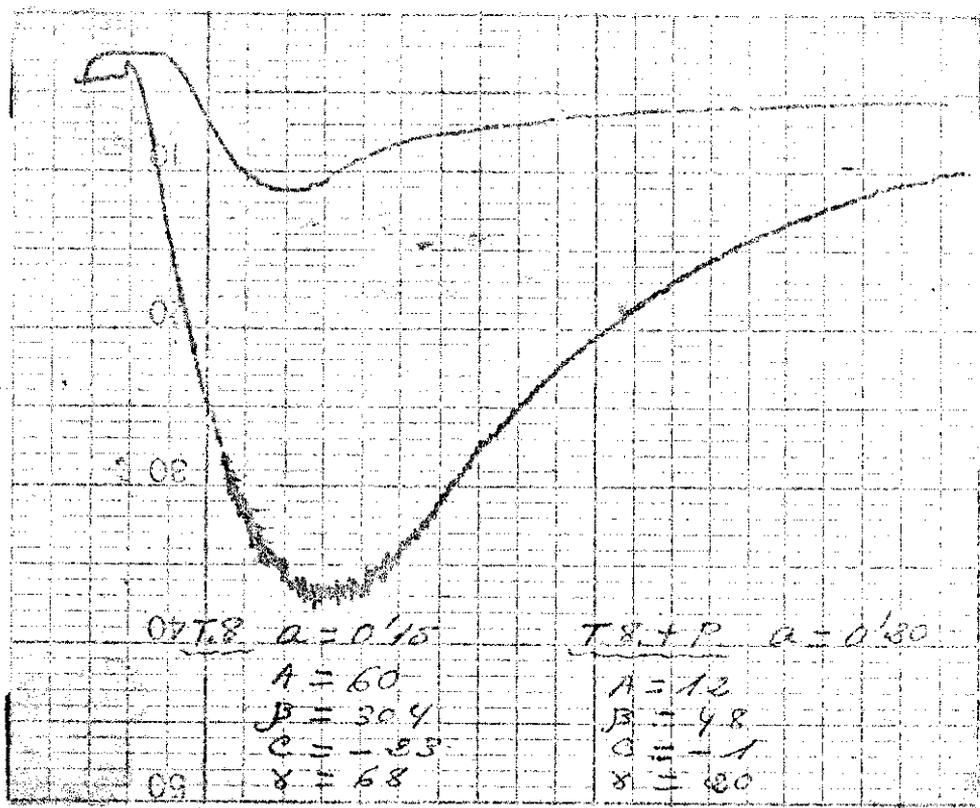
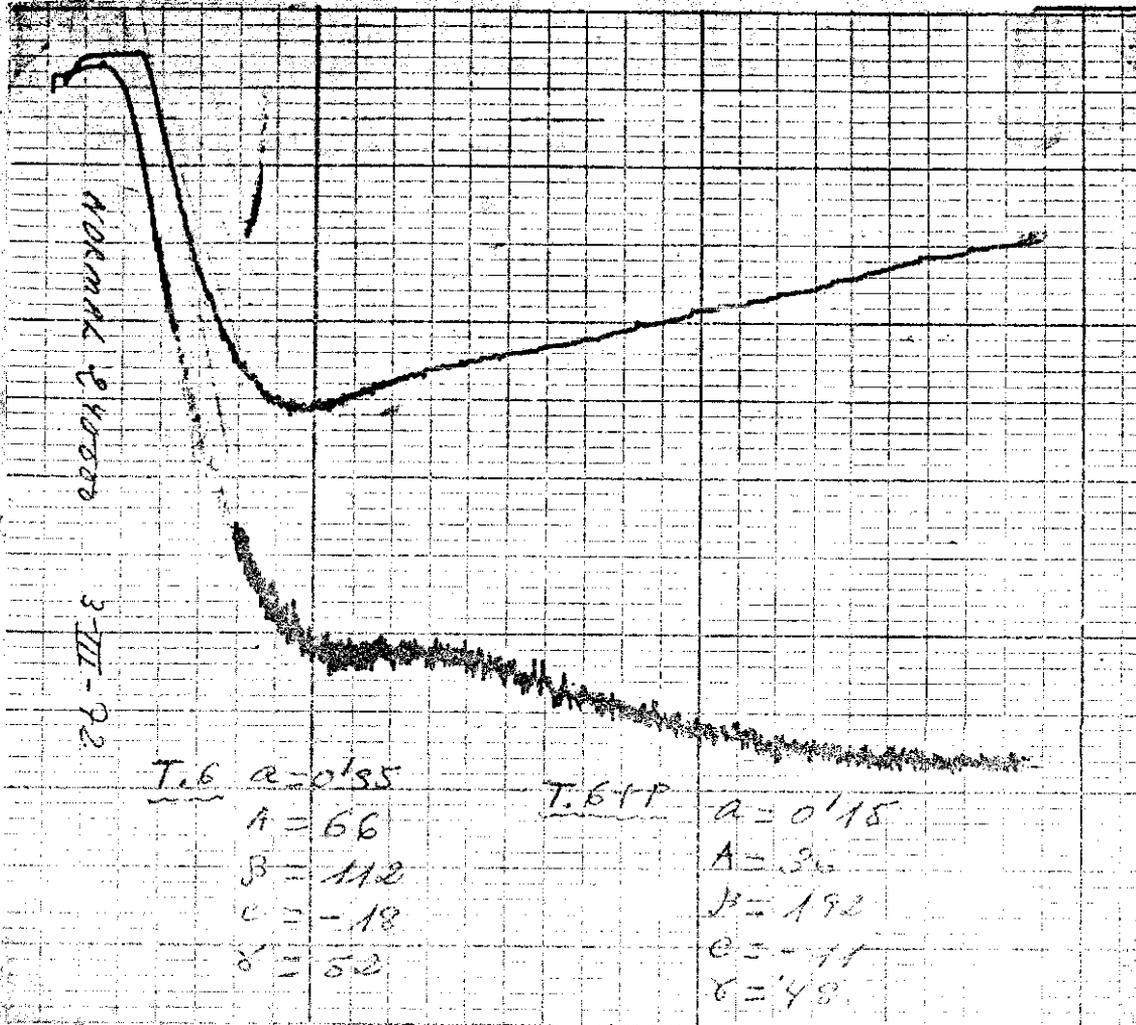
Gráfica 3. Normal.



Gráfica 4. Normal.



Gráfica 5. Normal.



Gráfica 6. Normal.



T.B.  $a=0'20$   
 $n=80$   
 $B=352$   
 $C=-24$   
 $\delta=84$

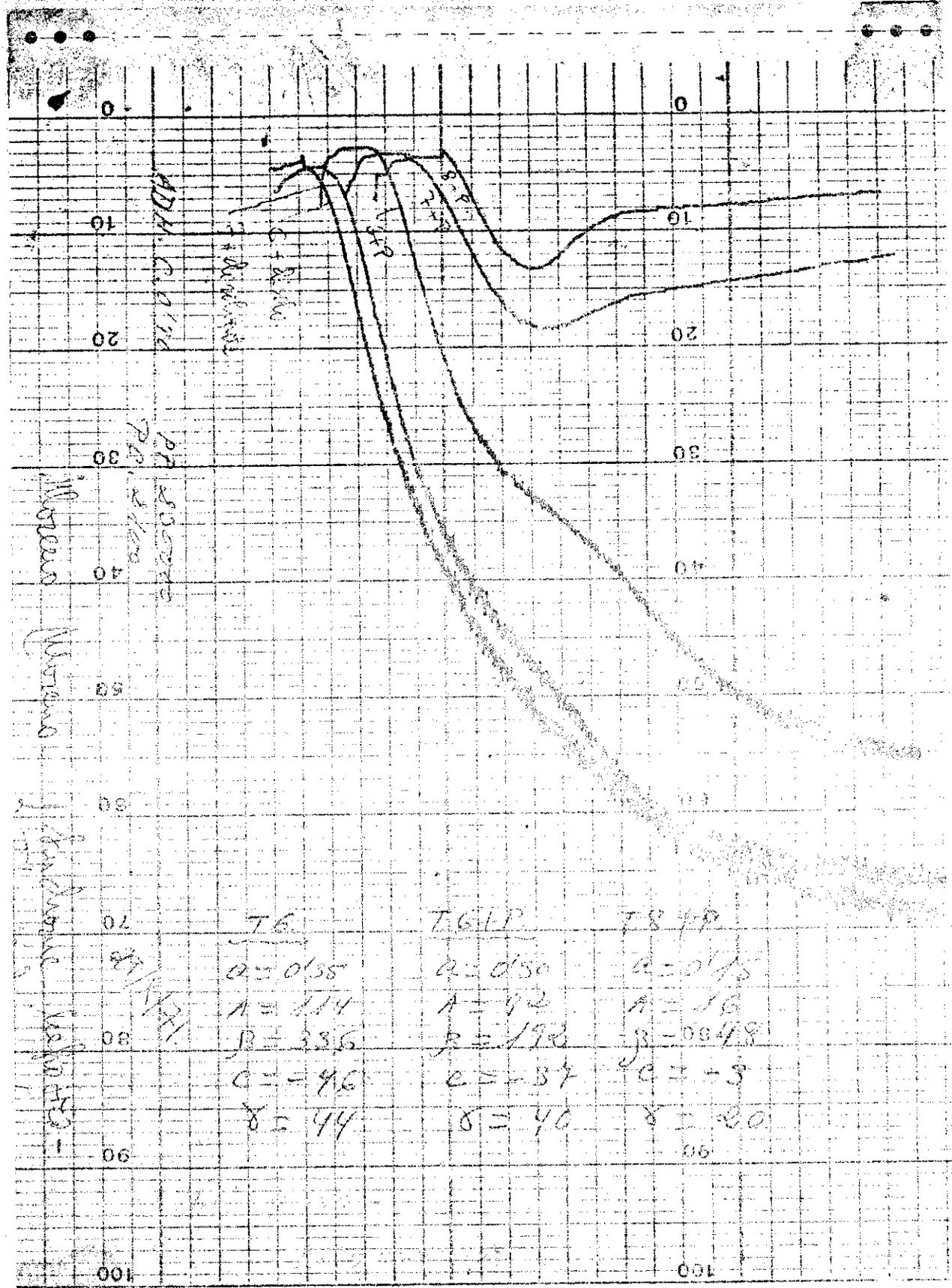
T.B+P  $a=0'20$   
 $A=48$   
 $B=256$   
 $C=-16$   
 $\delta=56$



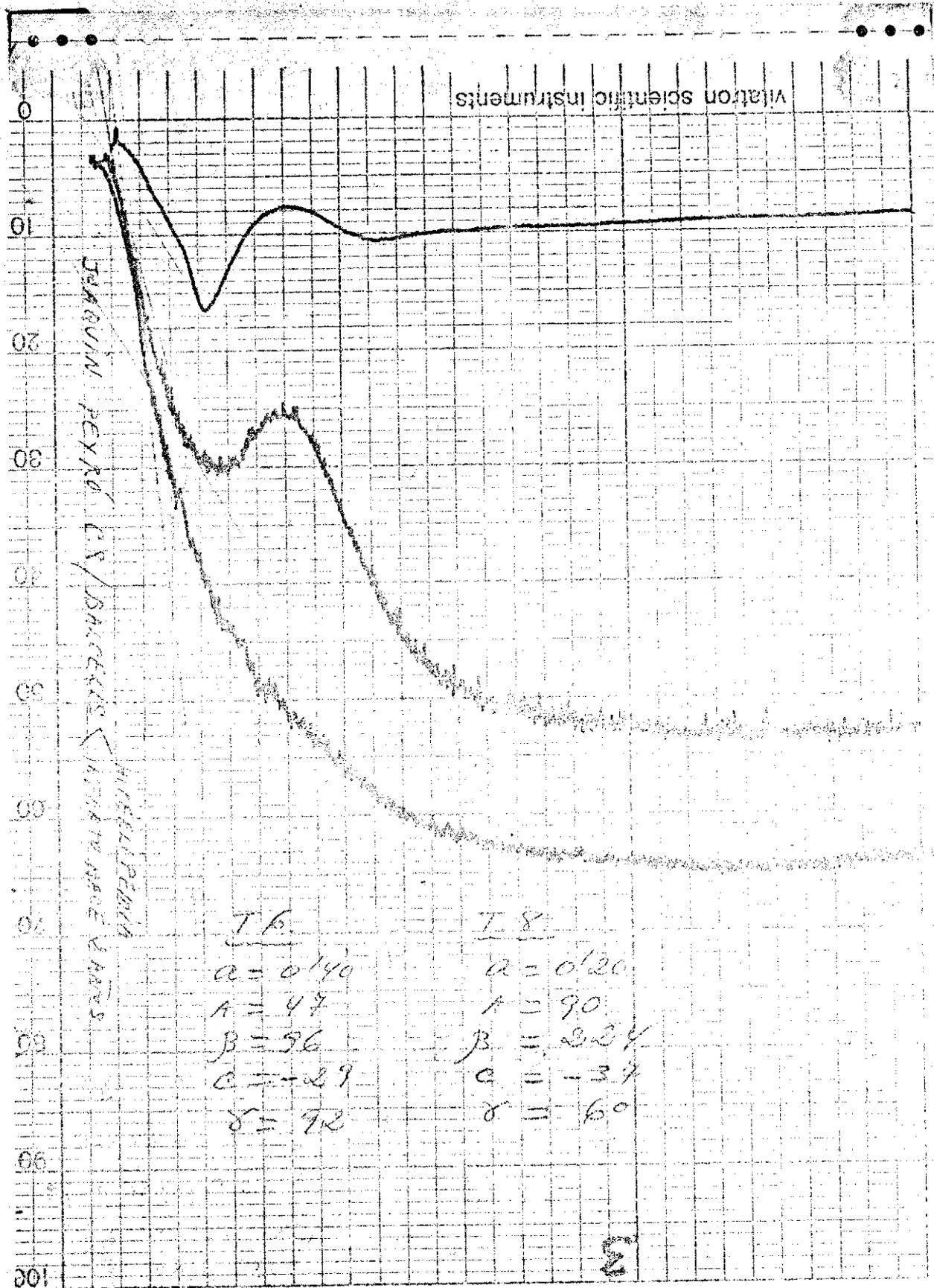
07 T. 2.  $a=0'20$   
 $A=60$   
 $B=256$   
 $C=-32$   
 $\delta=56$

T.B+P  $a=0'25$   
 $A=16$   
 $B=48$   
 $C=-3$   
 $\delta=20$

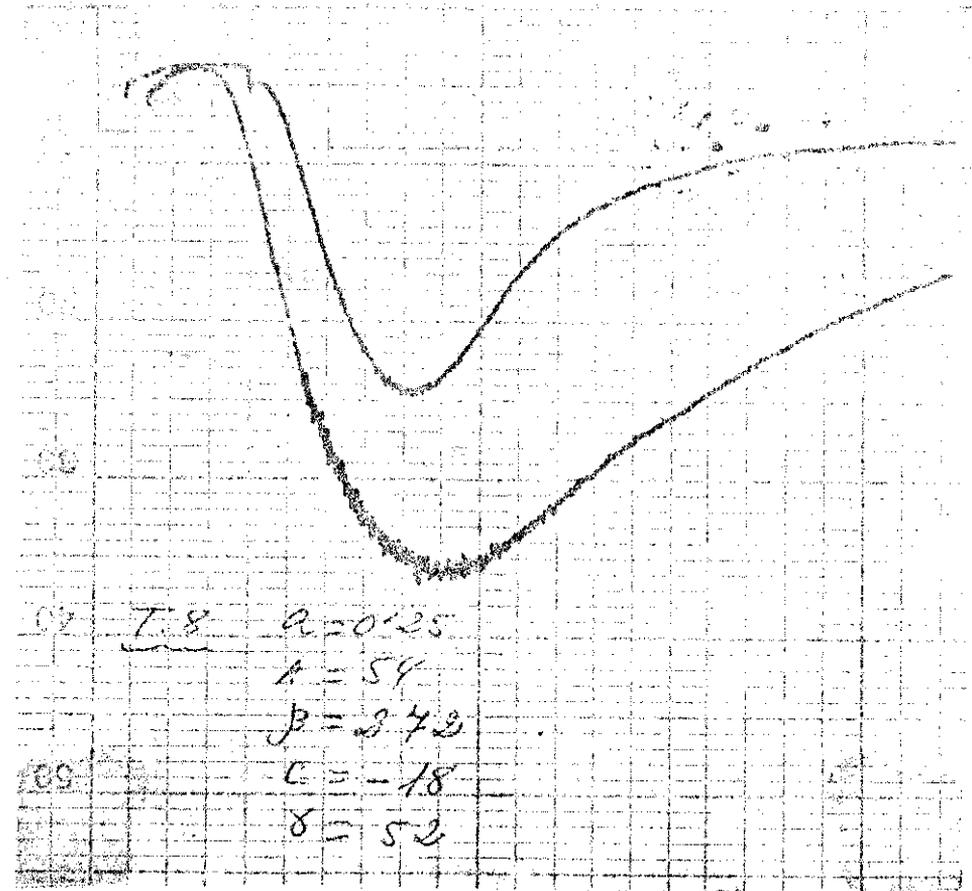
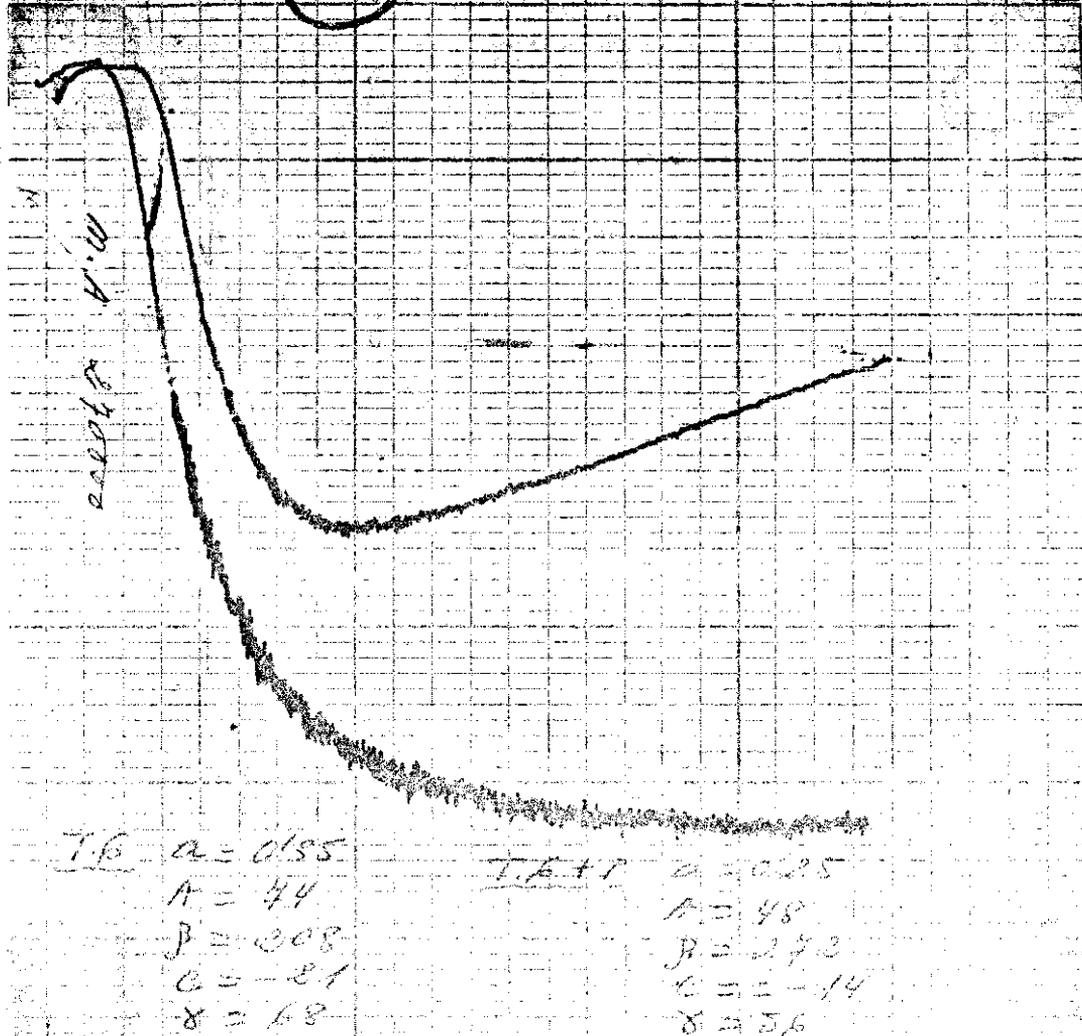
Gráfica 7. Normal.



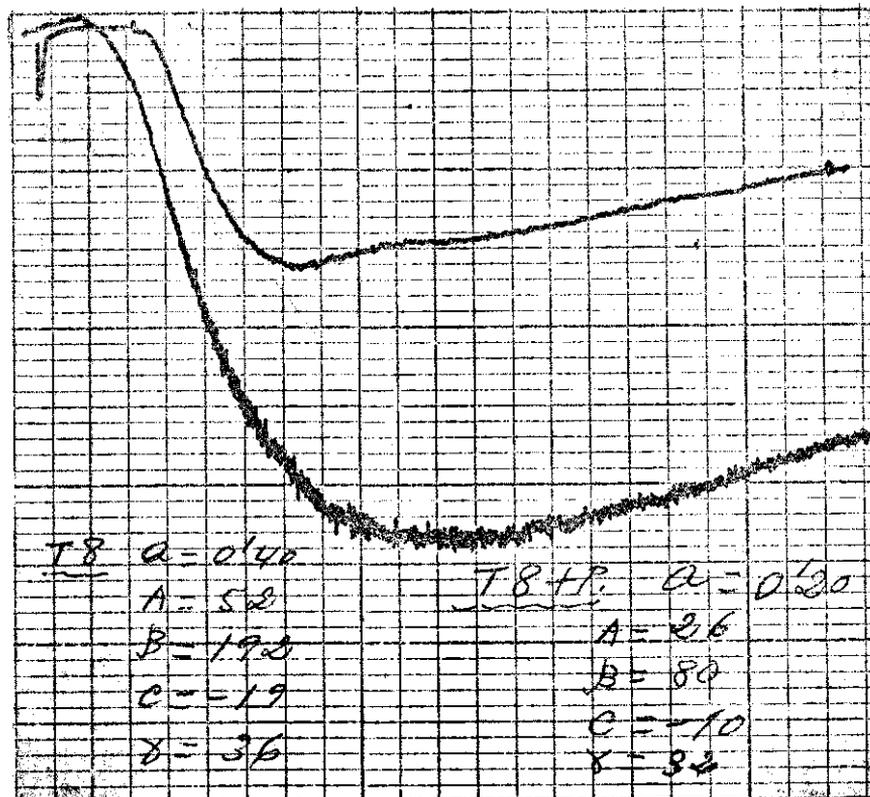
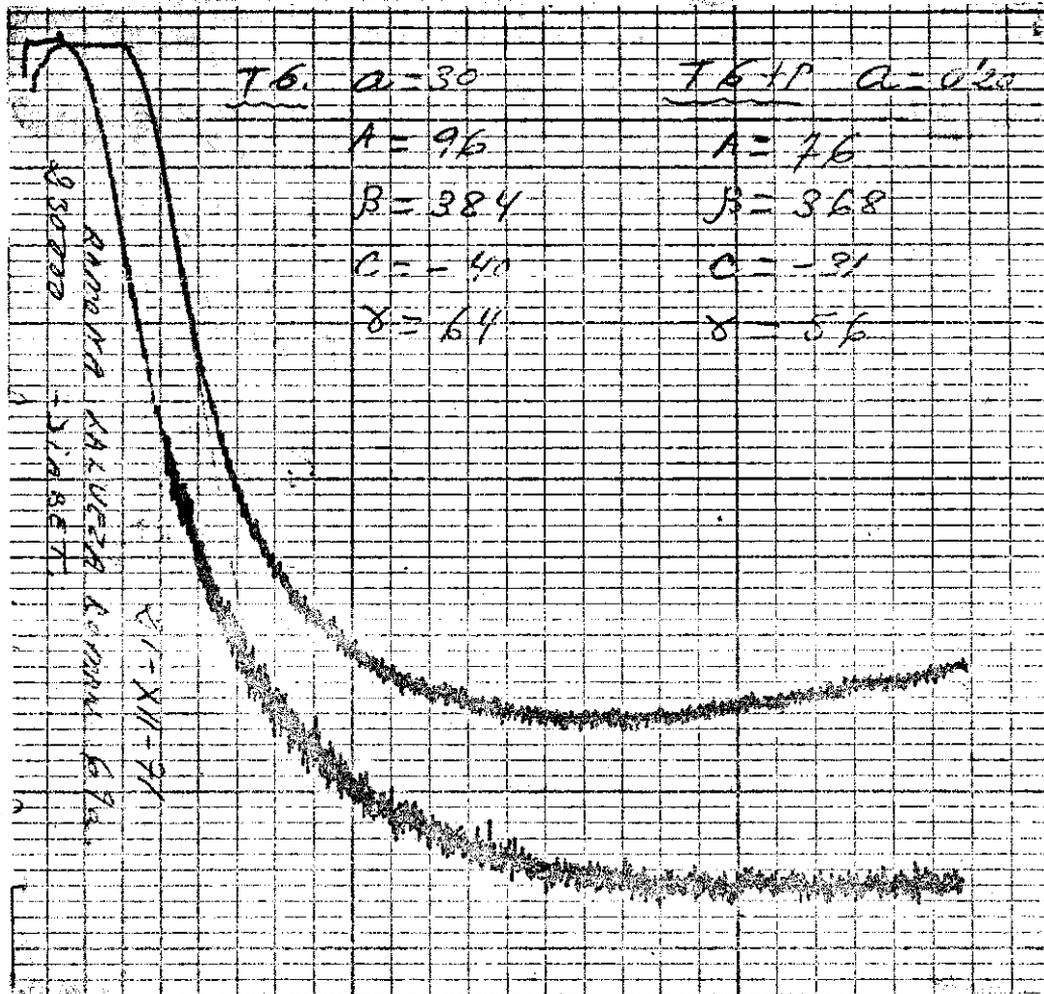
Gráfica 8.- Síndrome nefrótico; utilizando disolventes del dipiridamol, en vez de tampón de Michaelis a diferentes concentraciones de ADP.



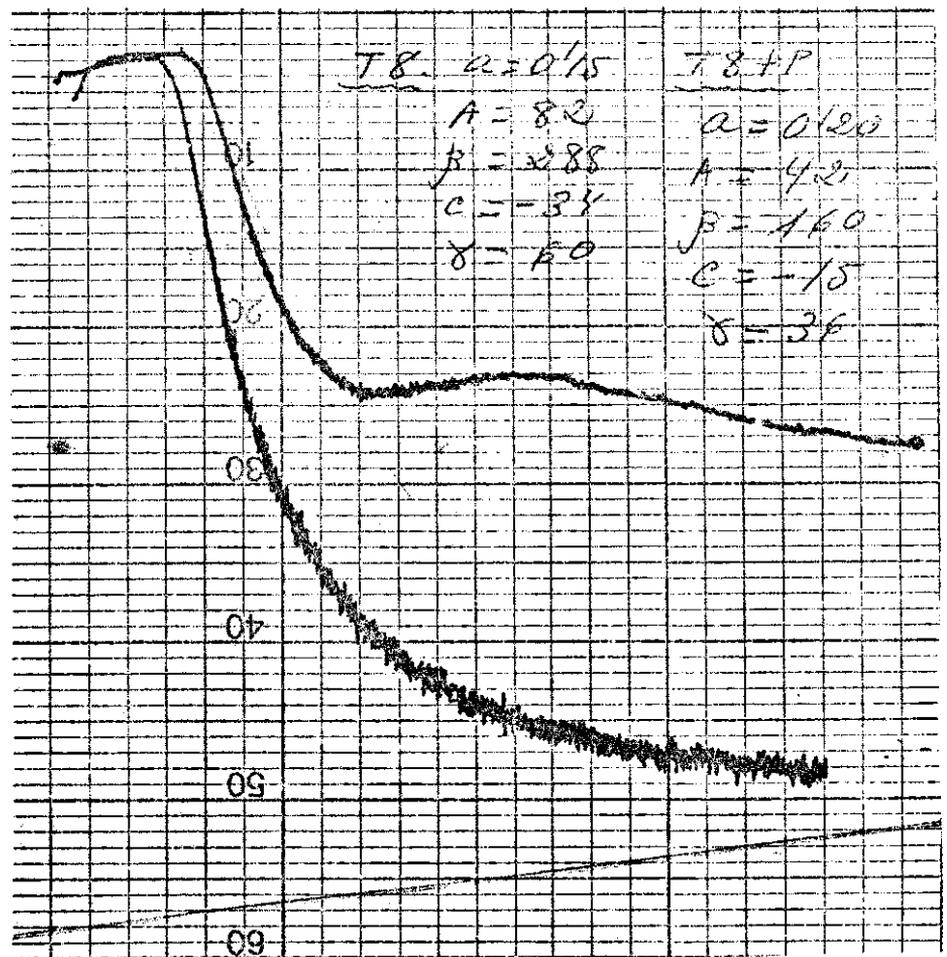
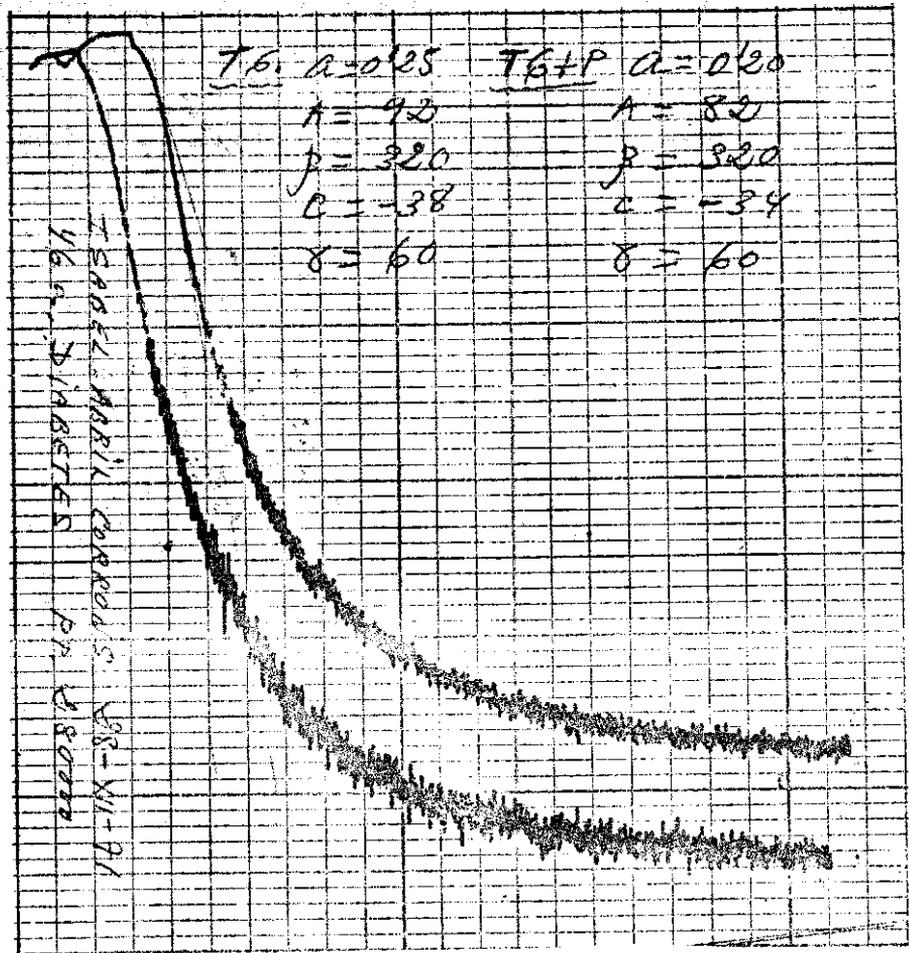
Gráfica 9.- Arteriosclerosis, Diferentes concentraciones de ADP.



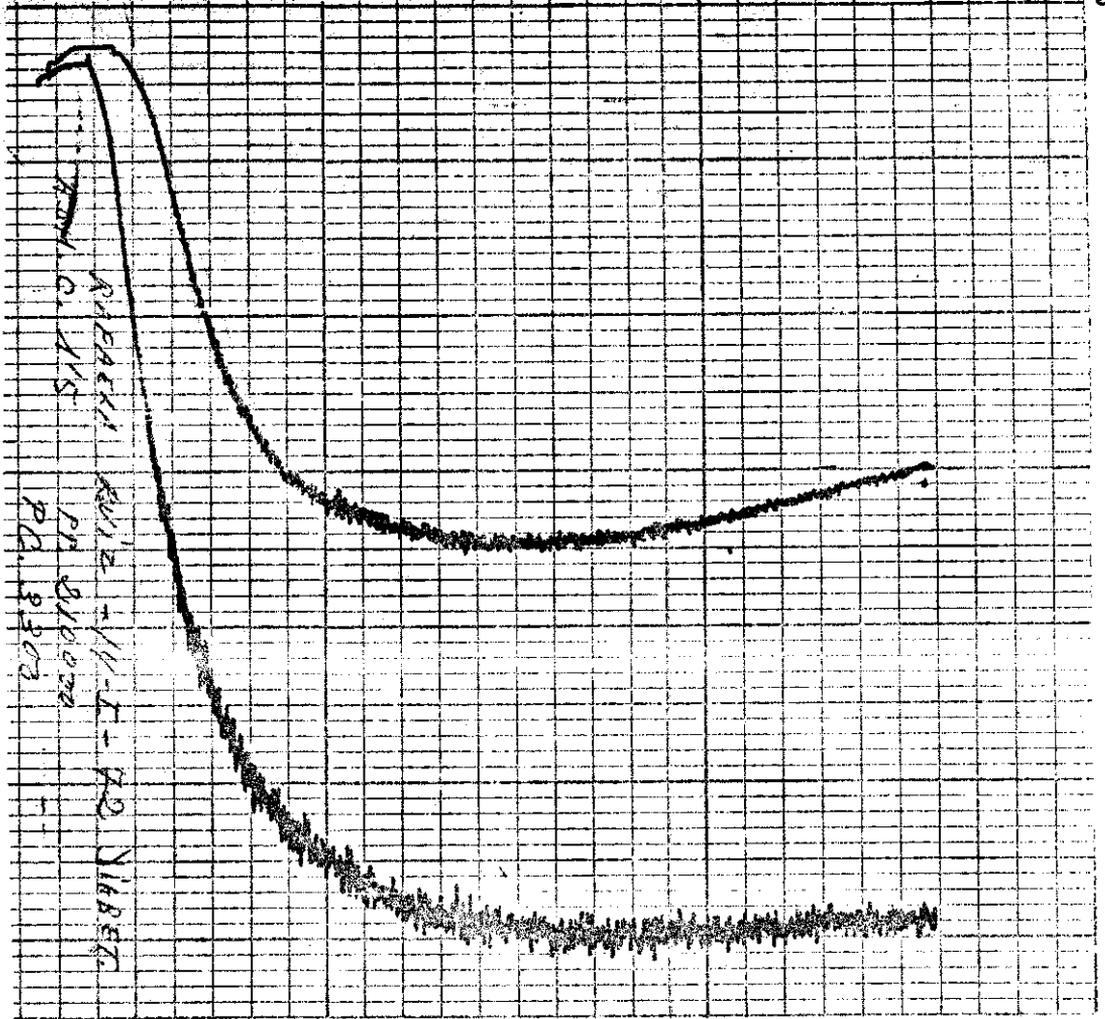
Gráfica 10.- Anovulatorios.



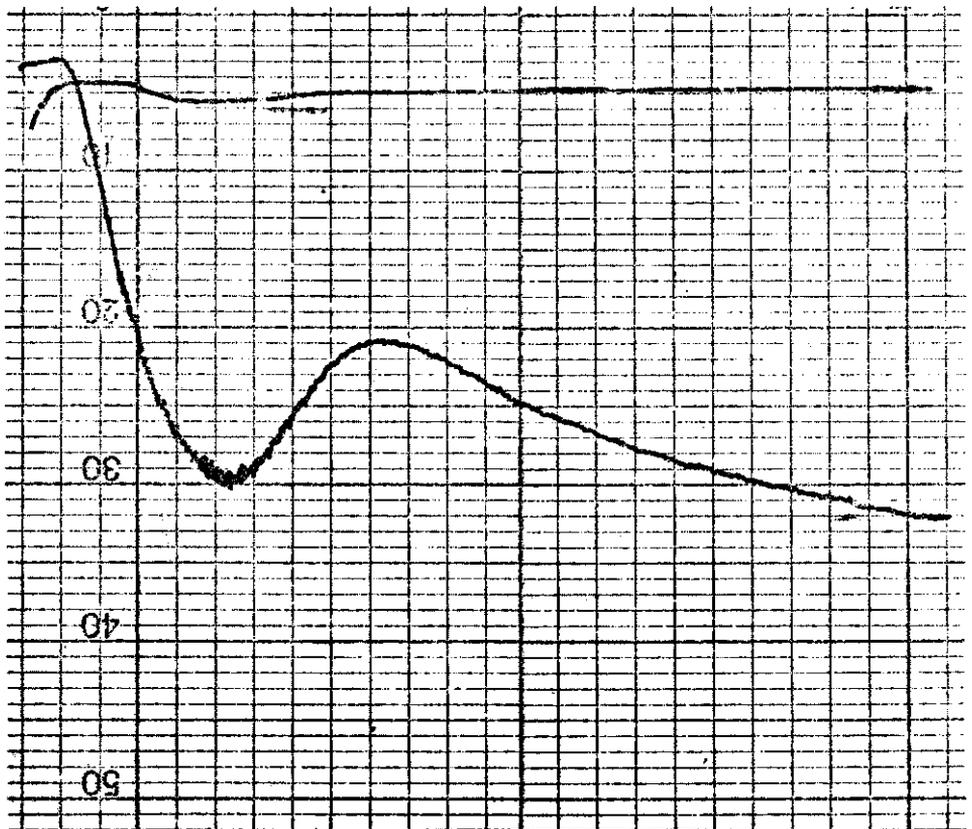
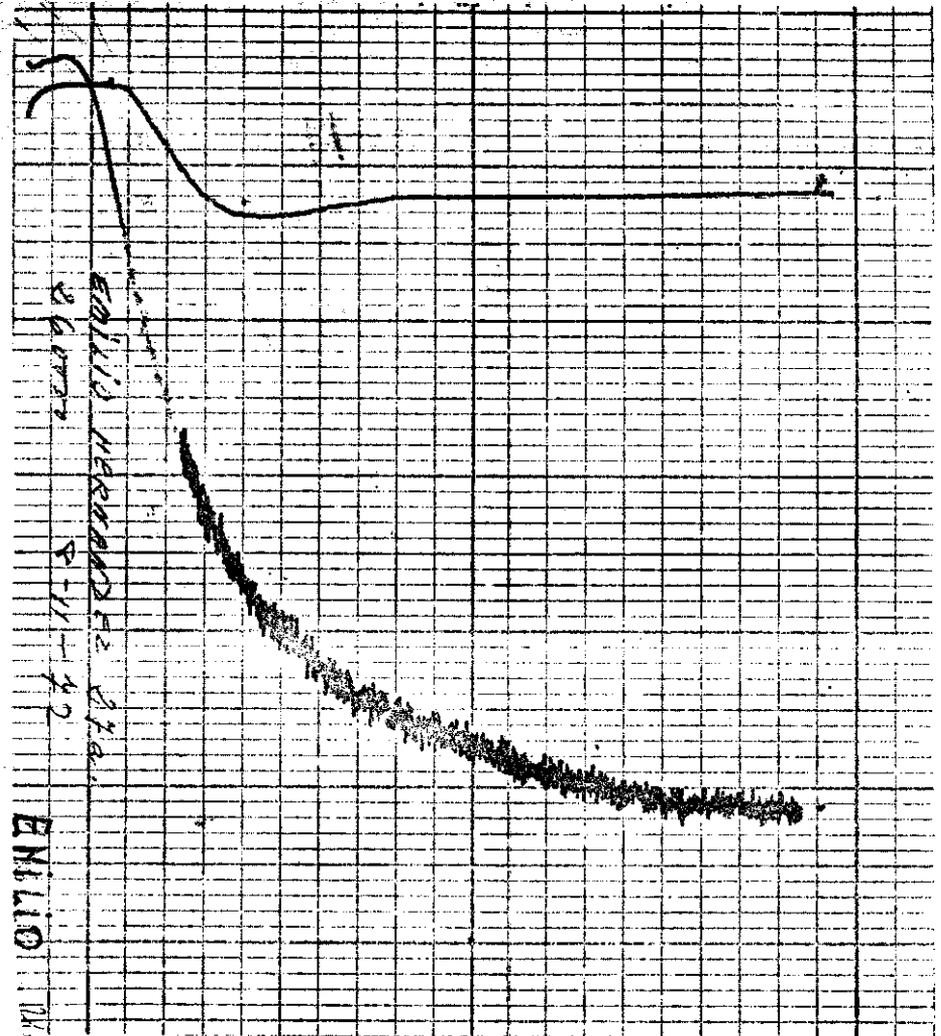
Gráfica 11.- Diabetes.



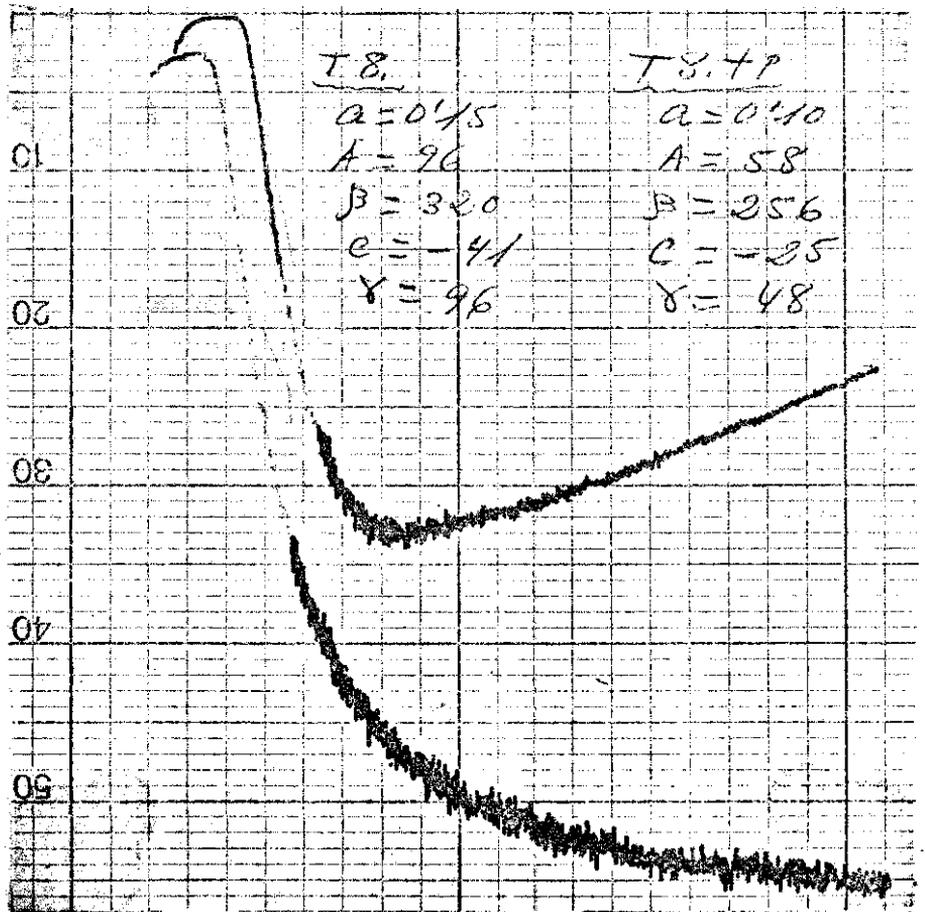
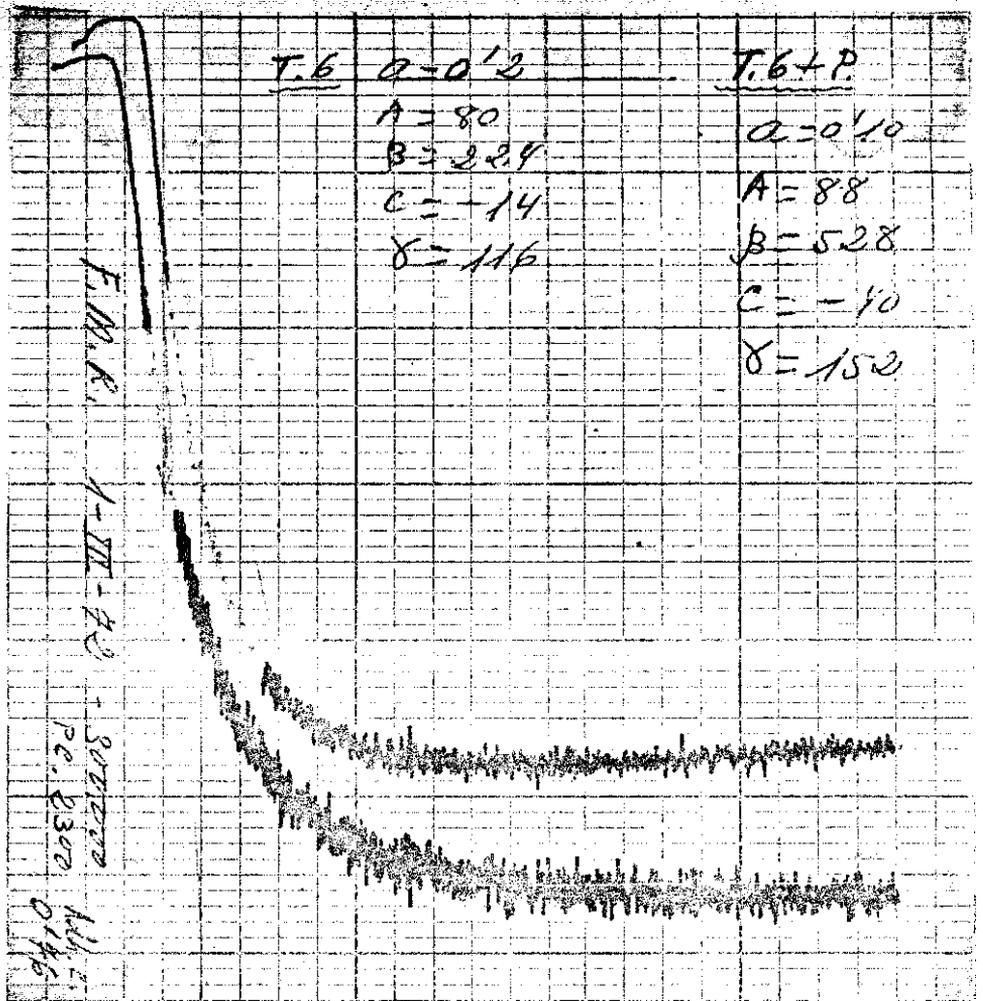
Gráfica 12.- Diabetes.



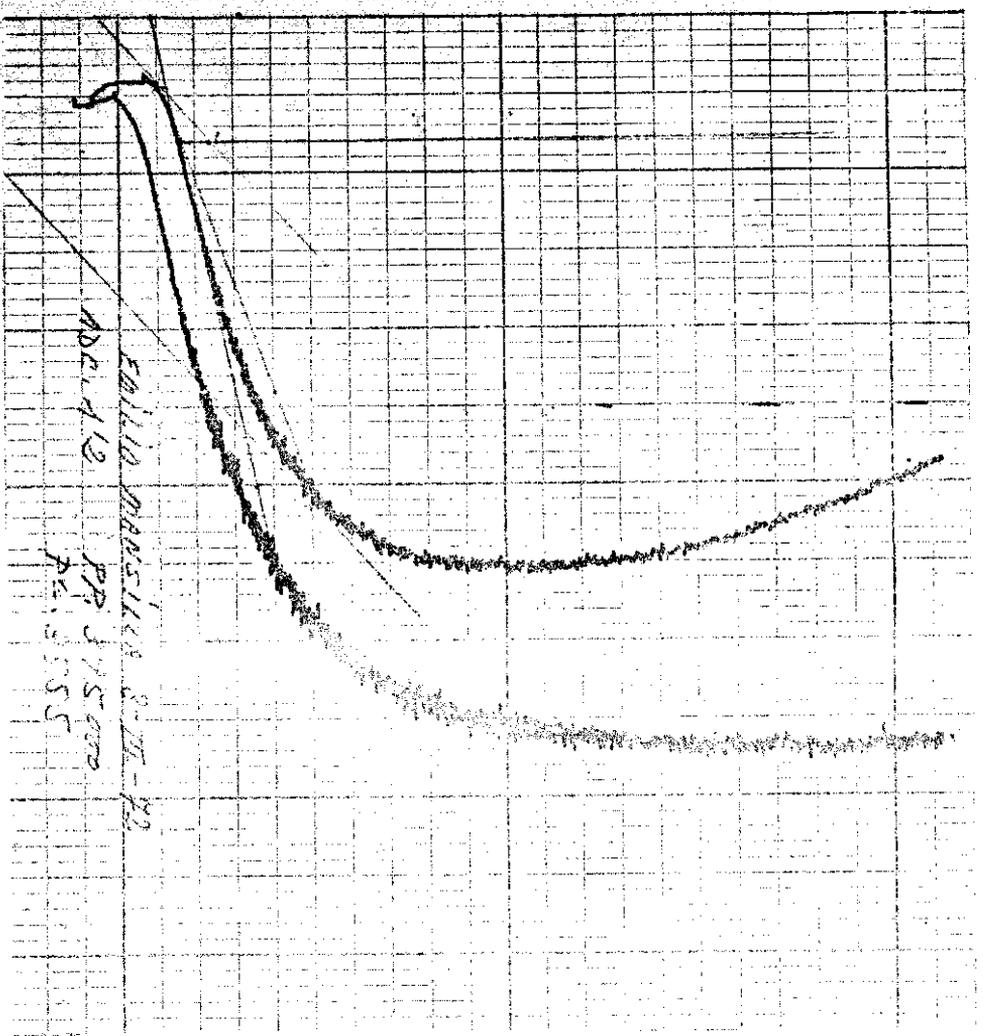
Gráfica 13.- Diabetes.



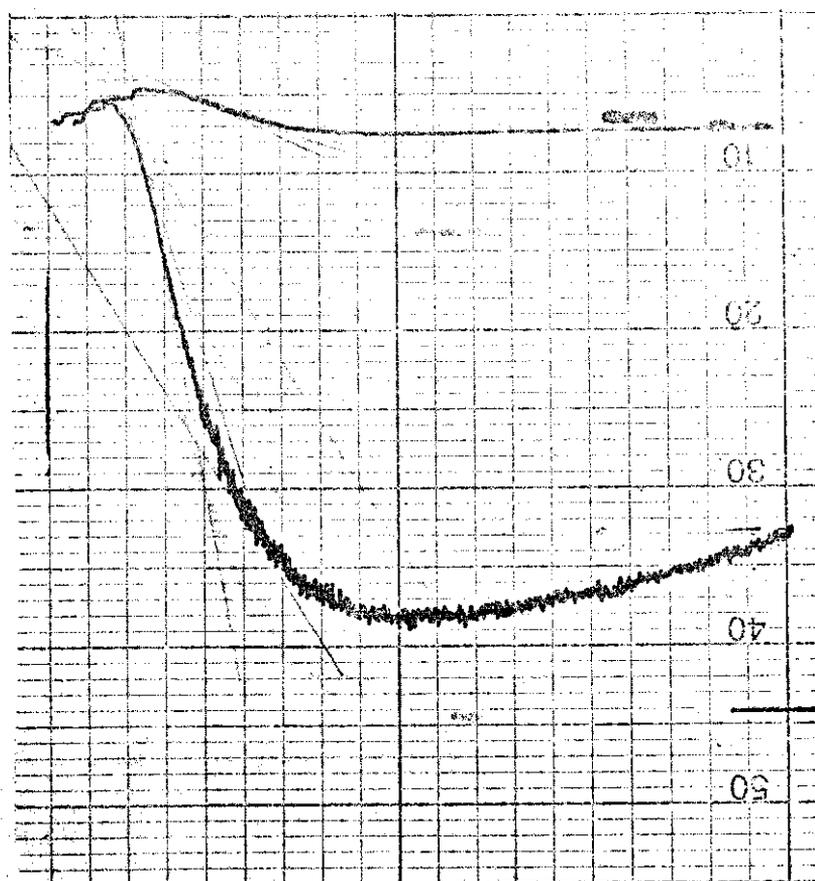
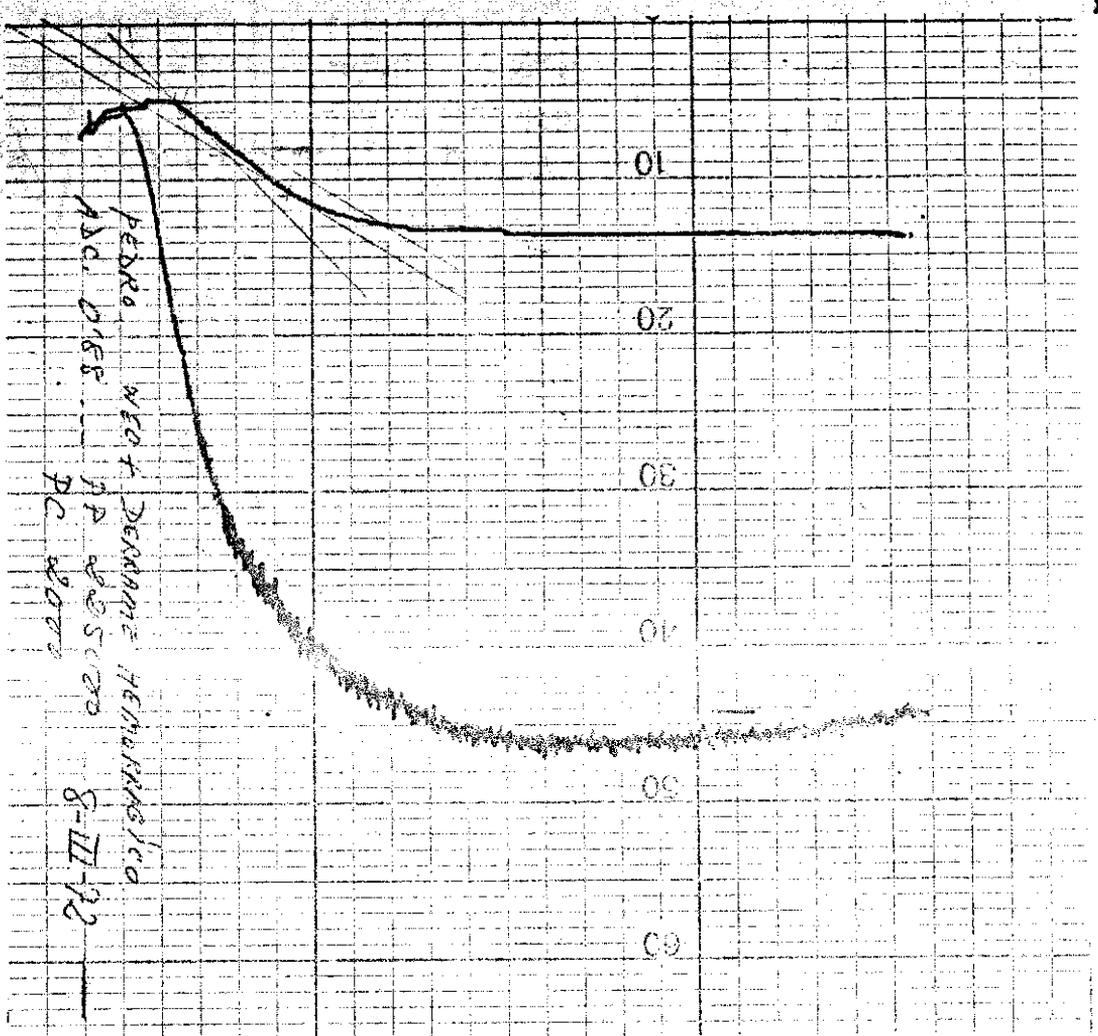
Gráfica 14.- Normal.



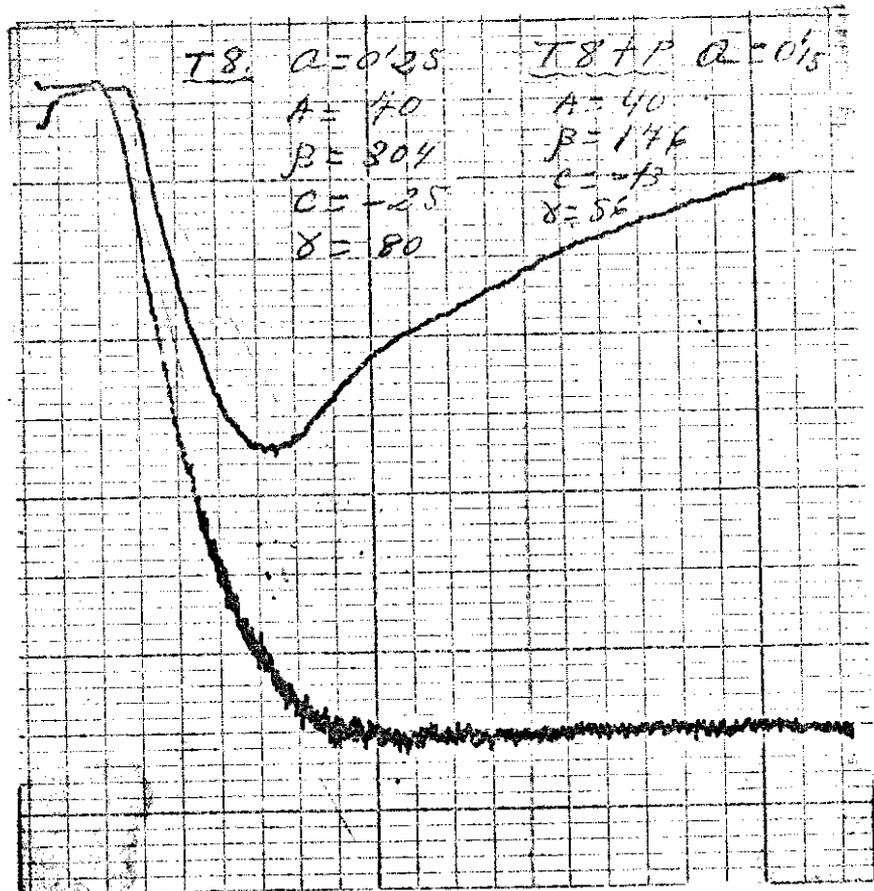
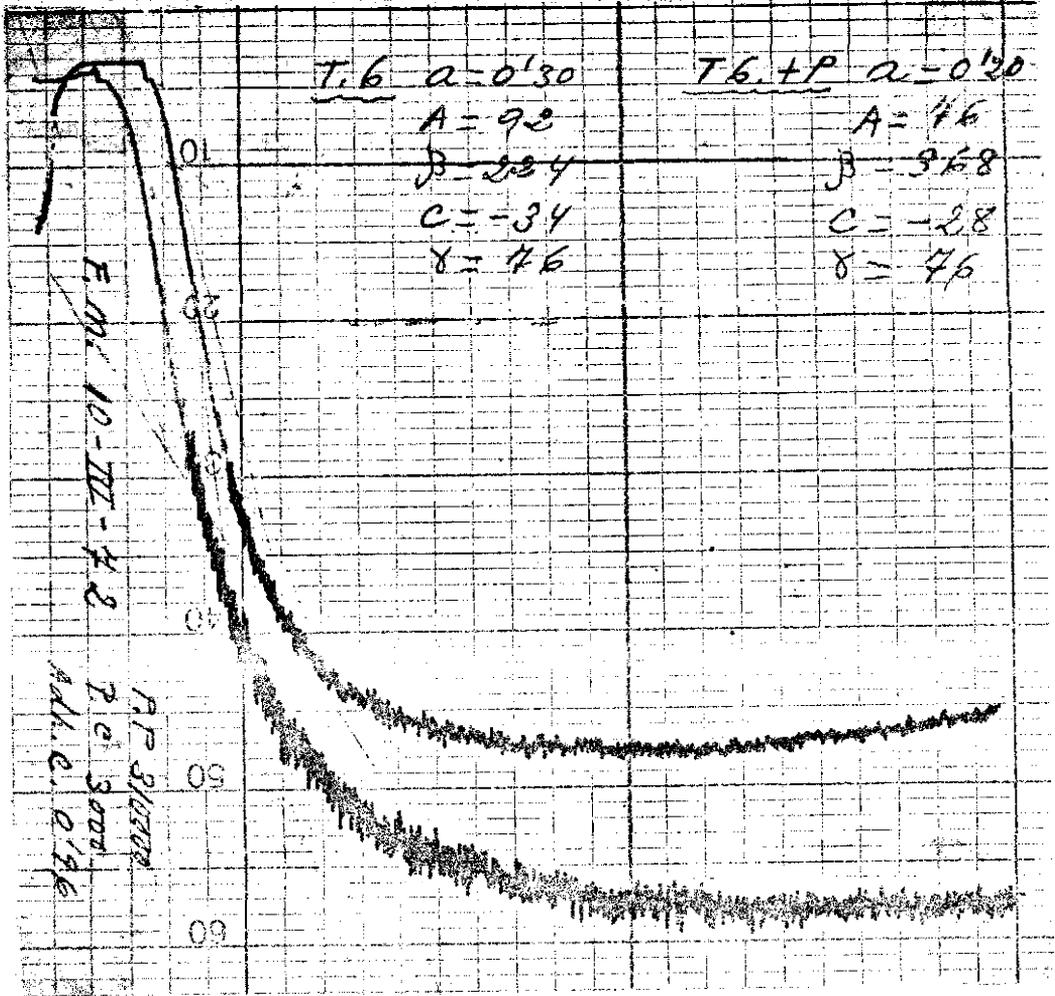
Gráfica 15.- Arterioesclerosis.



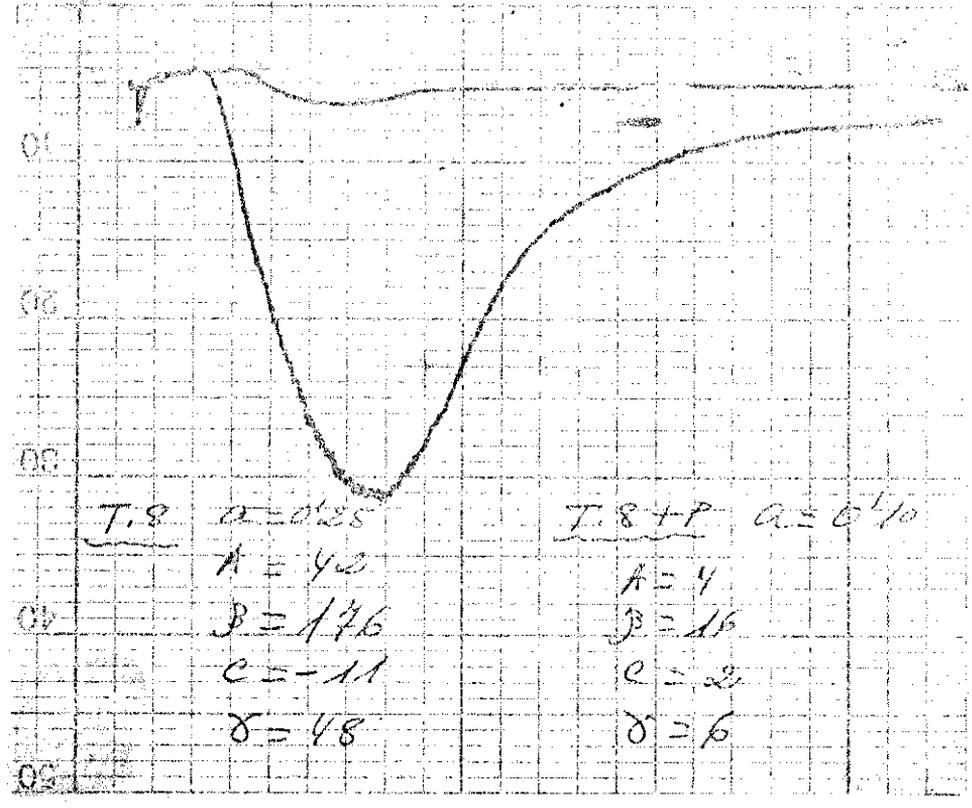
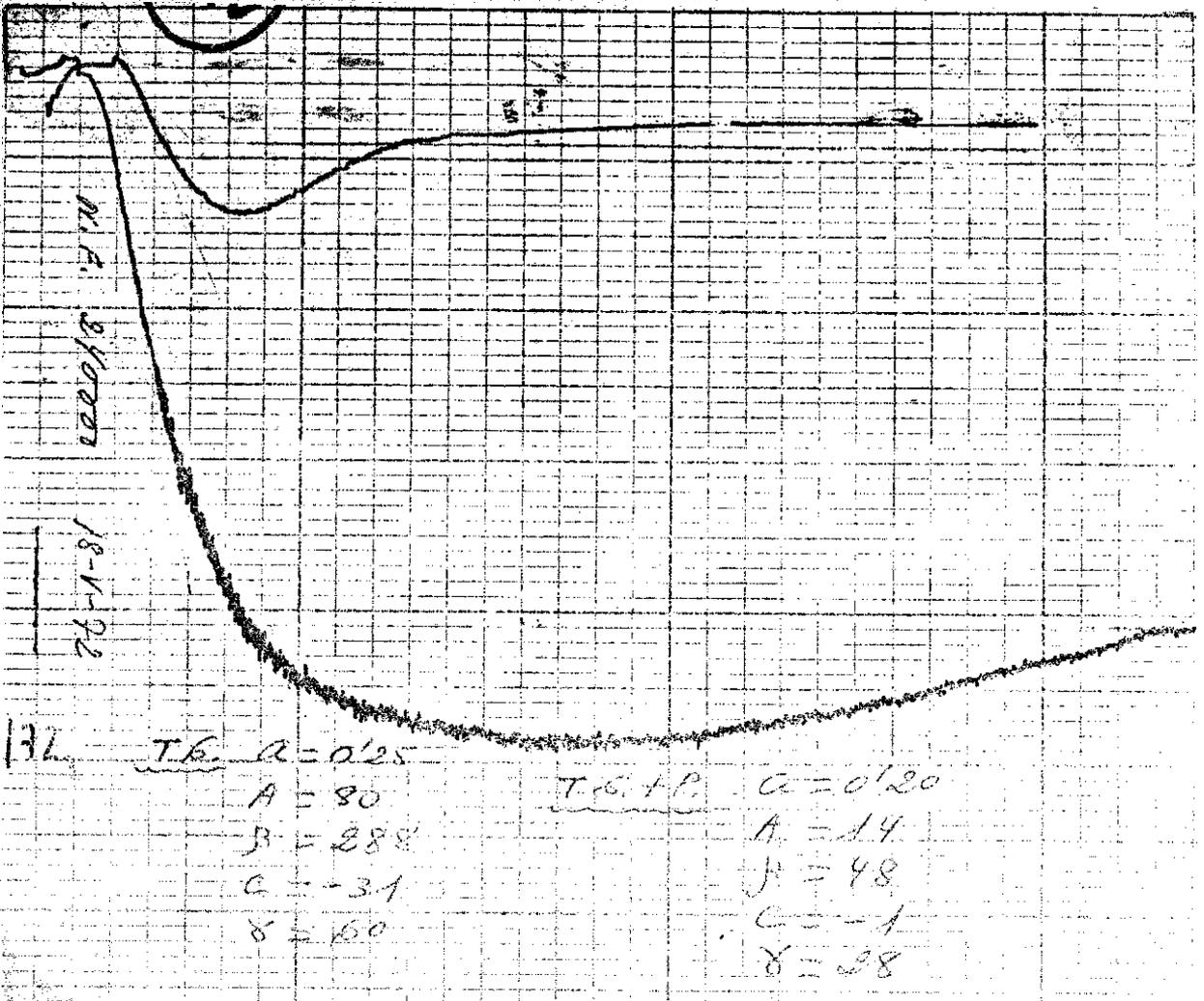
Gráfica 16.- Arterioesclerosis.



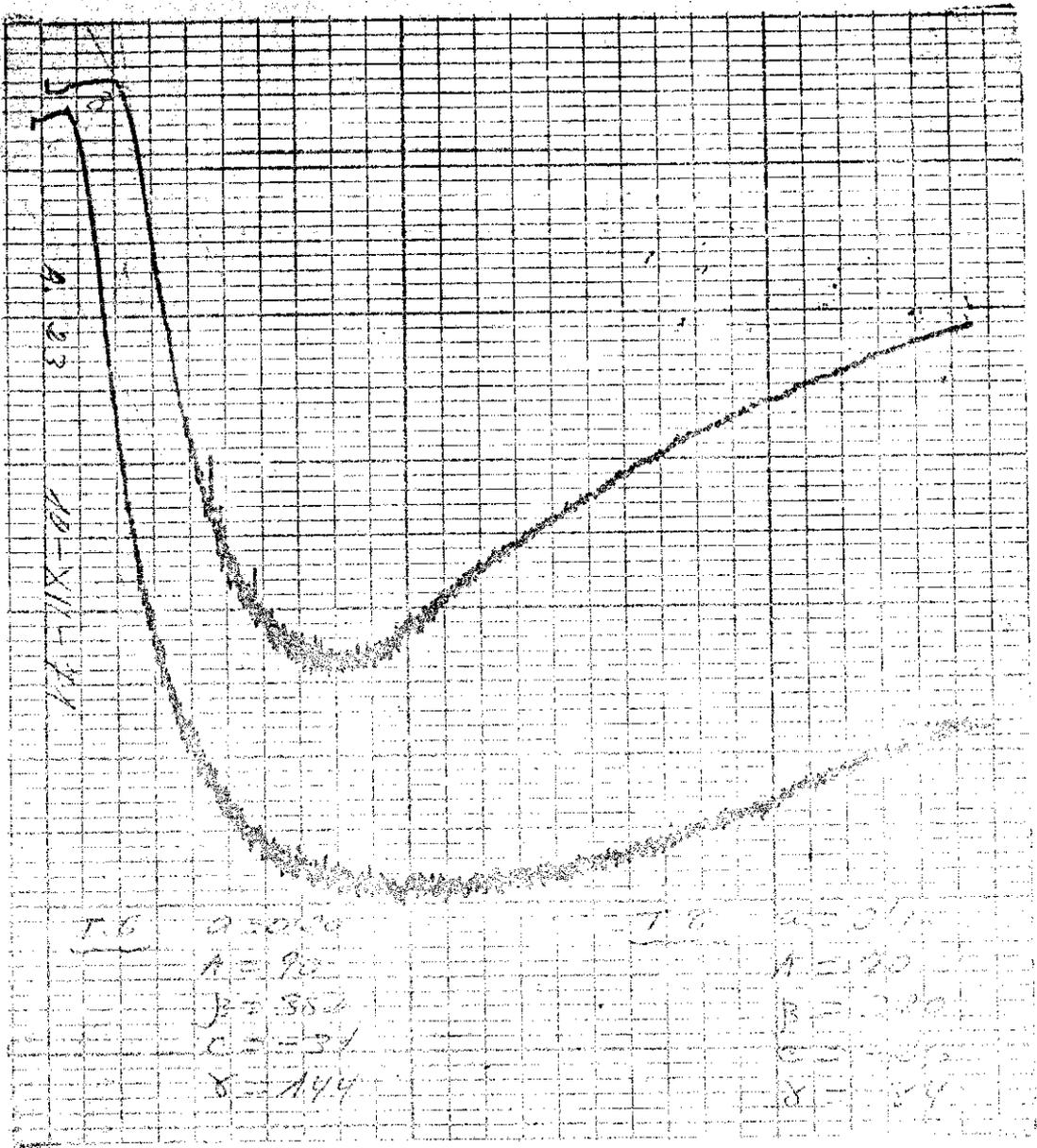
Gráfica 17.- Carcinoma bronquial.



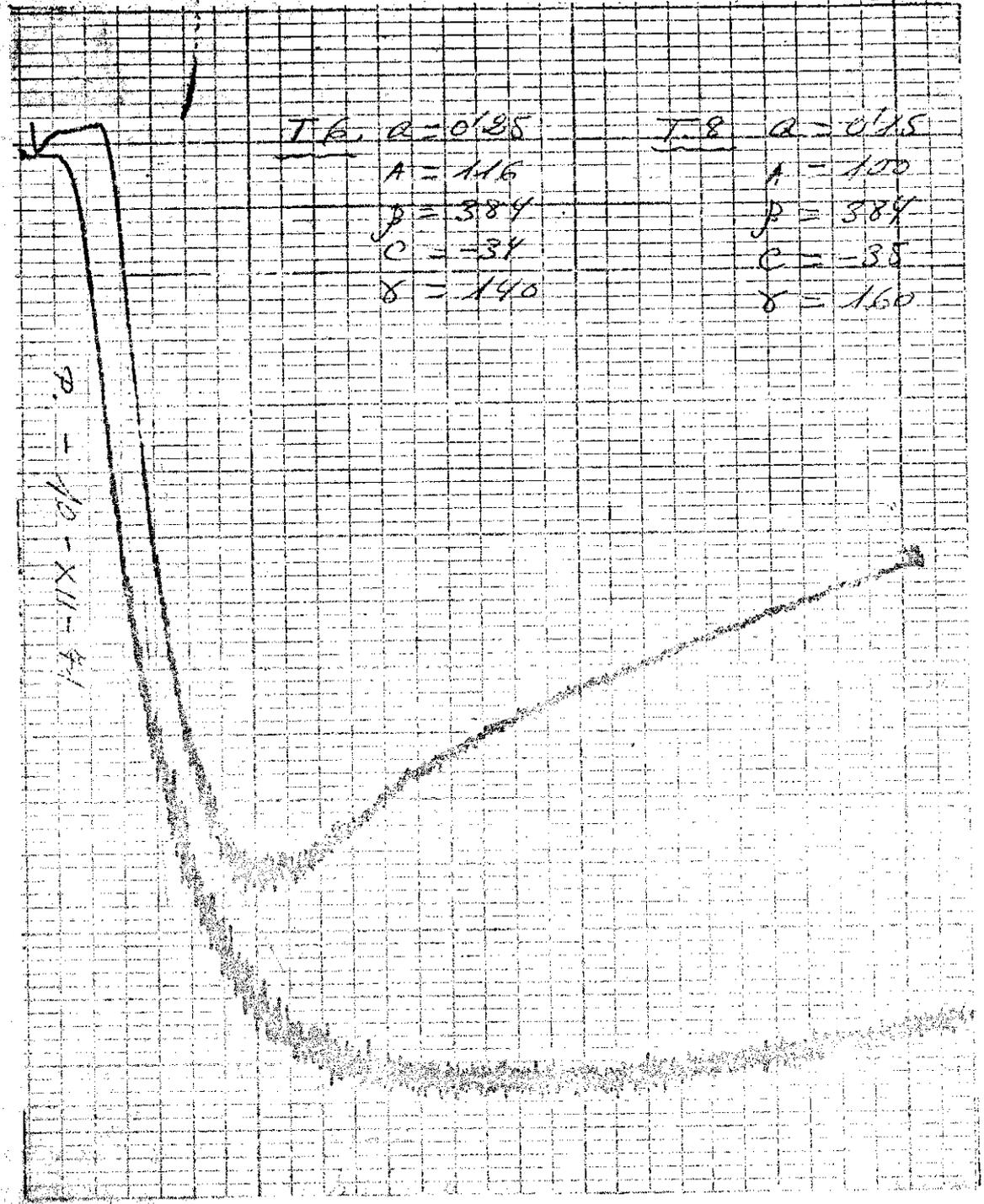
Gráfica 18.- Arteriosclerosis.



Gráfica 19.- Anovulatorios.



Gráfica 20.- Anovulatorios.



Gráfica 21.- Anovulatorios.

## DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES.-

Hasta el momento presente no ha sido hallado un método plenamente satisfactorio para la determinación de los lípidos totales. No obstante, el valor de este parámetro es de una importancia relativa, dado que no es infrecuente hallar individuos con valores de lípidos totales normales que presentan algunas de las fracciones lipídicas, que los integran, alteradas.

Diversos han sido los métodos utilizados para valorar los lípidos totales (Gravimétricos) Turbimétricos, Acidimétricos, gasométricos, Fotométricos, Volumétricos, Oxidimétricos, etc. De todos los métodos desarrollados se acepta con unanimidad que los que se aproximan más a la realidad son los métodos gravimétricos. No obstante estos métodos son excesivamente laboriosos, no prestándose a nuestro juicio para la rutina del Laboratorio; no obstante, en nuestro laboratorio lo utilizamos para los trabajos de precisión.

**FUNDAMENTO DE LOS METODOS GRAVIMETRICOS.-** Se toma una parte de suero, humor ó tejido se pesa, seguidamente, se procede a la extracción y purificación de los lípidos contenidos en la muestra. El extracto se evapora a sequedad y se pesa residuo.

De los restantes métodos utilizados para la valoración de los lípidos totales el procedimiento Fotométrico propuesto por ZOLLNER y KIRSCH ha tenido gran aceptación por su facilidad de ejecución y por dar resultados francamente reproducibles.

**FUNDAMENTO DEL METODO FOTOMETRICO DE ZOLLNER Y KIRSCH.-** Los lípidos del suero al ser tratados con solución de Fosfórico y Vainillina producen un color rosado que se puede determinar fotométricamente. Es necesario relacionar las extinciones con los valores obtenidos para las mismas muestras por métodos gravimétricos.

Este último método ha sido adaptado, para la valoración de los lípidos totales para nuestro trabajo, dada la sencillez de ejecución y su reproductibilidad y por considerar que los valores que con él se consiguen son suficientemente satisfactorios para su utilización en Clínica.

**TECNICA USADA EN NUESTRO TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES.-**

**Material:** Fotómetro especial ó de filtro.

Baño agua.

**Reactivos:**a) Reactivo de color: 4 partes de ácido fosfórico + 1 parte de solución Vainillina al 0,6%.

b) Patrón: el patrón de los test de lípidos totales del comercio, tiene la siguiente relación: 1.000 mg. de lípidos corresponden a 100 ml. Como patrón puede usarse también Monitrol. (Los cálculos varían para cada lote).

c) Acido sulfúrico para análisis (95-97%, densidad aproximada 1,84).

Para cada serie de análisis, solo se emplea una muestra anónima y una 6 dos muestras de patrón:

1. Poner con pipetas en tubos de ensayo:

	Análisis	Patrón	Anónimo
Suero	0,05 ml.	-	-
Patrón	-	0,05 ml.	-
Acido sulfúrico 95-97%	2,0 ml.	2,0 ml.	-

2. Mezclar bien y cubierto, calentar 10 minutos en agua hirviendo, enfriar a 5 ml en agua fría. De esta manera la mezcla reactiva ponerla en pipeta en tubo de ensayo limpio.

Mezcla reactiva	0,1 ml.	0,1 ml.	-
Acido sulfúrico 95-97%	-	-	0,1 ml.
Reactivo de color	2,0 ml.	2,0 ml.	2,0 ml.

3. Mezclar y pasados unos 40-50 min. comparar las extinciones del análisis y del patrón con el anónimo.

Extinción máxima: 530 nm.

Filtro: 510-560 nm, por ej. Hg 546 nm.

Espesor de capa: 1 cm.

Cálculo: Contenido total de lípidos =  $\frac{E_A \times 1.000}{E_S}$  mg/100 ml.

$E_A$  = Extinción del análisis

$E_S$  = Extinción del patrón.

Valores según experiencia personal:

500-800 mg(100 ml.

Valor medic 636 mg/100 ml.

DETERMINACION DE COLESTERINA

Se extraen 5 c.c. de sangre.

Se deja coagularse, reposar una hora.

Se toman 3 décimas de suero y se ponen en un tubo especial de colessterinas.

Preparar standard (3 décimas).

Añadir en cada tubo (Pb y St) 1,8 c.c. de ácido sulfosalicílico (cob la pera) y mezclar.

Añadir 4,5 c.c. de ácido acético anhidro.

Tapar los tubos con tapón de vidrio esmerilado, agitar (Tejos de la vista).

Dejar enfriar durante 30 minutos.

Añadir 6 décimas de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> puro y mezclar.

Poner los tubos 10 minutos en sitio oscuro.

Leerlo en colorimetro con filtro 61.

Blanco H<sub>2</sub>O destilada.

C culo:

St  $\approx$  5<sup>o</sup> a 60  $\approx$  66

98

DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS

Las técnicas más usuales para la valoración de fosfolípidos se basan en la determinación del fósforo lipídico. Los resultados se expresan en fósforo de fosfolípidos y como lecitina, calculando este a partir de aquel multiplicándolo por un factor.

Las determinaciones del fósforo se realizan en los extractos ó precipitados correspondientes tras digestión con sulfúrico, perclórico, nítrico, etc. y valoración del fósforo inorgánico resultante.

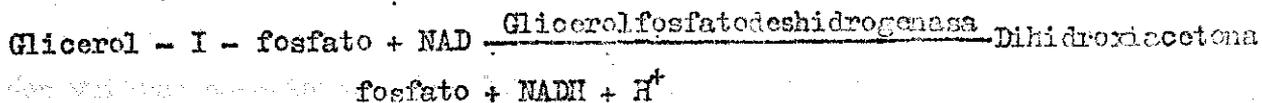
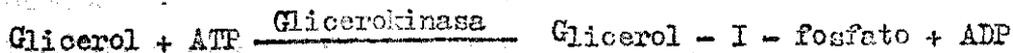
La mezcla extractiva más utilizada es la formada por etanol-éter; el extracto obtenido con ella puede servir para determinar el fósforo.

Otros métodos combinan extracción y precipitación; se opera efectuando una extracción con alcohol-éter, pasando el fósforo a éter de petróleo y precipitándolo con acetona y solución saturada de cloruro magnésico en etanol, en este precipitado se determinan los fosfolípidos.

ZILVERSMIT y DAVIS introdujeron una técnica de valoración de fosfolípidos en un precipitado proteico obtenido al tratar el suero con tricloroacético. Estos autores utilizan el ácido perclórico para efectuar la digestión del precipitado.

Se pueden separar los fosfolípidos de los demás componentes lipídicos mediante la cromatografía en columna de ácido silícico. Se opera, como a continuación se indica: Se efectúa un extracto de los lípidos del suero por el método de MUECH y se pone en la columna, esta se somete a dos eluciones, la primera utiliza como eluyente el cloroformo, consiguiéndose la separación de glicéridos, colesterol libre y colesterol esterificado. Una segunda elución con metanol separa los fosfolípidos que pueden ser valorados por los procedimientos ya descritos.

ZOLLNER en 1962, propuso un método enzimático para la valoración de glicerofosfolípidos. Este comprende las siguientes etapas: a) Cromatografía en columna de ácido silícico, b) Hidrólisis de fosfolípidos con KOH, c) Paso del glicerol-fosfato a glicerol, mediante fosfatasa ácida, d) valoración del glicerol, formado por el método de WIELAND.



(Test de WARBURG)

Del NADH<sub>2</sub> formado se deduce el glicerol presente y de este los glicerofosfolípidos.

Técnica usada para nuestro trabajo:

Material: Fotómetro especial ó de filtro.

Baño de agua.

- Reactivos: a) Patrón de fósforo 5 mg% en agua destilada (solución nº 1)  
 h) Solución de ácido tricloroacético 1,2 N (solución nº 2)  
 c) Solución de molibdato amónico 0,04 M en ácido sulfúrico 2,5 N (sol. 3)  
 d) Solución de Vanadato amónico 0,021 M en ácido nítrico 0,98 N (sol. 4)  
 e) Acido perclórico 70% p.a.  
 f) Agua oxigenada 30% p.a.

Desproteínización.--

Se pipetea en tubo de centrifuga de 10 ml.

- Suero, resp. orina diluida 0,1 ml.
- Solución 2 2,0 ml.

Se mezcla bien, déjese estar 10 min. a la temperatura ambiente y centrifugar 10 minutos.

El sobrenadante claro se vierte en un tubo de ensayo y se usa para la determinación del fósforo inorgánico. El tubo de centrifuga se coloca boca abajo durante 5 min. sobre papel de filtro y luego se separa el resto del sobrenadante con papel de filtro. El precipitado sirve para la determinación del fósforo de fosfolípidos.

Fósforo de fosfolípidos en el suero.

Pipetear en tubos de ensayo y en el precipitado del tubo de centrifuga (muestras 6 prueba) respectivamente:

	Blanco	Standard	Prueba
Acido perclórico	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.
Solución 1	-	0,1 ml.	-
Agua oxigenada	4 gotas	4 gotas	4 gotas

Mézclese y déjese 15 min. a 180-200°C con el bloque de calefacción ó baño de aceite de silicona ó de parafina. El contenido del tubo de centrifuga debe ser absolutamente claro ó incoloro; en otro caso, debe añadirse después de enfriar otra 4 gotas de agua oxigenada y digerir nuevamente 15 min. Después enfriar a la temperatura ambiente, añádanse:

Agua destilada	2,0 ml.	2,0 ml.	2,0 ml.
Solución 3	1,0 ml.	1,0 ml.	1,0 ml.
Solución 4	1,0 ml.	1,0 ml.	1,0 ml.

Mézclese y al cabo se mide la extinción de la prueba (Standard) frente al blanco.

Con valores superiores a los 50 mg/100 ml. de fósforo en suero ó 1 g. por 100 ml. de fósforo en orina se mezclarán 0,2 ml. de suero resp. de dilución de orina con 8,0 ml. de suero salino fisiológico y se repite la desproteínización así como determinación con 0,1 ml. de esta dilución (resultado x 5).

II. Fósforo total.

Para la determinación del fósforo total se digieren 0,1 ml. de suero, directa-

mente sin desproteinización con 0,5 ml. de ácido perclórico, baja adición de agua oxigenada como se ha descrito para "fósforo de fosfolípidos" y también de los mismos volúmenes de agua, solución 3 y solución 4.

Medida y cálculo como en "fósforo de fosfolípidos".

Determinación colorimétrica.-

Longitud de onda: 400-420 nm. (p. ej. Hg 405 na); cubeta de vidrio, 1 cm. esp. de luz; temperatura 20-25°C; medida frente a blanco.

Fósforo de fosfolípidos y total, fosfolípidos.-

Prueba x 6 = mg. de fósforo de fosfolípidos, resp. total fosfolípidos en 100 ml. standard de suero.

Fósforo de fosfolípidos x 25: mg. de fosfolípidos como lecitina en 100 ml. de suero.

Valores normales en suero.-

5-12 mg. de fósforo de fosfolípidos en 100 ml.

150-250 mg. de fosfolípidos en 100 ml.

OBSERVACIONES.-

Empléese solo suero reciente y libre de hemolisis. Siempre primero se determinará la glicerina libre y luego la grasa neutra. Los sueros intensamente lipémicos se diluirán 1+9 con suero fisiológico para la determinación de la glicerina.

Se recomienda averiguar una vez, para cada envase el valor en blanco. Para ello se efectuará la determinación con agua en vez de suero. La diferencia de extinción que se presenta así después de la adición de la suspensión 4 se restará cada vez de la diferencia de la extinción con la prueba. Si se pone un extracto Folch-Sperrey de tejido ó suero se evaporará después de filtración la mezcla de disolventes. El residuo se saponifica como se describe con 0,5 ml. de lejía de potasa alcohólica.

SAPONIFICACION.-

En tubo de centrifugación se pipeteen:

- Suero 0,20 ml.
- Potasa alcohólica 0,50 ml.

Se mezcla, se cierran los tubos de ensayo con tapones limpios ó parafilm, se deja estar 30 min. a 70°C en baño maría y se enfría luego a la temperatura ambiente.

Solución de sulfato magnésico 1,00 ml.

Se mezcla bien, se centrifuga y se ponen 0,50 ml. ó 0,2 ml. de sobrenadante claro para la determinación de la glicerina.

DETERMINACION DE GLICEROL EN SUERO (LIBRE) O EN EL SAPONIFICADO (TOTAL).-

Condiciones de trabajo:

Longitud de onda: 366 nm. 340 nm. ó 334 nm.

Cubeta de vidrio: 1 cm. de paso de luz.

Temperatura: 20-25°C.

Medida frente al aire ó solución diluida de ácido nítrico (1-2 gotas del 1,2% en 100 ml. de agua).

Pipetear en una cubeta:

	macro-ensayo	semi-microensayo
Solución 1	2,50 ml.	1,00 ml.
Solución 2	0,10 ml.	0,05 ml.
Suero ó sobrenadante	0,50 ml.	0,20 ml.
Suspensión 3	0,02 ml.	0,01 ml.

Mézclase con la espátula de plástico y déjese estar 10 min. a la temperatura ambiente. Luego se mide la extinción  $E_1$ .

Suspensión 4	0,02 ml.	0,01 ml.
--------------	----------	----------

Mézclase y espérese la parada de la reacción (unos 40 min.), ó en otro caso hágase otras 3-5 lecturas en intervalos de 2 minutos y extrapolar  $E_2$  al tiempo de la adición de la suspensión.

$$4. E_1 - E_2 = AE.$$

DETERMINACION DE GLICERIDOS

La técnica empleada en nuestro trabajo es la de EGGSTEIN. Con ello se determina el glicerol libre del suero, tras saponificar este se determina el glicerol total y por diferencia entre el total y el libre se obtiene el glicerol de glicérido, éste se transforma en triglicérido multiplicando por el peso molecular medio de estos (885).

La reacción transcurre en tres etapas:

- a) Glicerol + ATP Glicerokinasa Glicerol-1-fosfato + ADP
- b) Fosfoenolpiruvato + .ADP Piruvatokinasa Piruvato + ATP
- c) Piruvato + NADH + H<sup>+</sup> Lactodeshidrogenasa Lactato + NAD

Determinado el NAD (test de WARBURG) se conoce el glicerol y de éste se deducen los triglicéridos presentes en el suero.

Material.

Espectotómetro.

Baño maría.

Reactivos:

- 1) Solución tampón 0,1 M trietanolamina  
0,004 M sulfato magnésico hasta 150ml.
- 2) NAD 0,006 M; ATP 0,033 M y PEP 0,011 M (solución 2)
- 4) 2 mg. SK/ml. (solución 4)
- 3) 2 mg. LDH/ml. 1 mg. PK/ml. (solución 3)
- 5) Solución etanólica de KOH 0,5 M.
- 6) Solución sulfato magnésico 0,15 M.

Abreviaciones químicas:

- NAD ..... Nicotilamido adenosin dinucleótido
- ATP ..... Adenosin trifosfato
- PEP ..... Fosfoenol piruvato
- LDH ..... Lactodeshidrogenasa
- PK ..... Piruvatokinasa
- GK ..... Glicerokinasa

Con diferencias de extinción sobre 0,400 (366 nm) ó 0,800 (340 nm) (334 nm) se mezclan 0,1 ml. de suero ó del sobrenadante con 0,9 ml. de suero fisiológico y se

repite la determinación con 0,5 ml. resp. 0,2 ml. de esta dilución (resultado x 10).

**CALCULO.-**

Las relaciones de volúmenes de Test entre los ensayos y semi-micro no es exactamente 2,5 : 1. La pequeña diferencia está por debajo del 1% y puede despreciarse. Para los ensayos macro y semi-micro pueden emplearse los mismos factores de cálculo.

**GLICERINA LIBRE.**

- E 366 nm. x 17,5 mg.% de glicerol en suero.
- E 340 nm. x 9,30 = mg.% de glicerol en suero.
- E 334 nm. x 9,60 = mg.% de glicerol en suero.

**GLICERINA TOTAL DESPUES DE LA SAPONIFICACION.-**

- E 366 nm. x 149,0 = mg.% de glicerol total en suero.
- E 340 nm. x 79,0 = mg.% de glicerol total en suero.
- E 334 nm. x 82,0 = mg.% de glicerol total en suero.

mg.% de glicerol total - mg.% de glicerol libre = mg.% de glicerol de glicérido  
 mg.% de glicerol x 9,62 = mg.% de grasa neutra.

**Valores normales en suero:**

- Glicerol libre: 0,5-1,7 mg.%
- Glicerol de glicérido: 7,7-17,9 mg.%
- Grasa neutra: Triglicéridos 74-172 mg.%

## LIPOPROTEINAS

### ACETATO DE CELULOSA.

Método de COLFS y VERHEYDEN.

Al momento del uso preparar el colorante:

Rojo Ciba 73	100 mg.	
Negro Sudán		
Etanol	60 ml.	Disolver bien. No filtrar.
NaOH 5%	40 ml.	

Una vez terminada la electroforesis:

- Sumergir 5 min. en acético 2,5%.
- Colorante, durante 2 horas. Desechar después del uso.
- Lavar con agua del grifo durante 1-2 minutos.
- Conservar sumergidos en agua.

Leer en densitómetro si se desea.

Es posible desecar las tiras, para lo cual después de lavar con agua del grifo se seguía este proceso:

- Fijar en formaldehído 40% durante 1 minuto.
- Sumergir en glicerol 7% durante 2 minutos.
- Extender en una placa de vidrio, eliminado el exceso de líquidos con papel de filtro.
- Secar a 50-60°C observando de cerca la desecación (4-5 min.) y en seguida que empiece a emblanquecer, despegar en caliente.
- Introducir las tiras entre papeles de filtro con un peso encima.

109

LIPIDOGRAMA SOBRE PAPEL

COLORACION DIRECTA DEL SUERO ANTES DE LA ELECTROFORESIS.-

Este método presenta mejores ventajas sobre la técnica clásica, en especial se gana tiempo y se obtienen mejores resultados.

El método es como sigue: Preparar un pequeño volumen de solución saturada de "Noir au gras" (Biolyon) en alcohol absoluto calentando la solución a 70° al baño maría, durante 10 minutos ó 15 minutos. Filtrar.

Añadir al suero 10% de su volumen de la solución colorante /2 c.c. de suero y 0,5 c.c. solución Noir au gras). Dejar en contacto una hora agitando fuertemente. Centrifugar.

Efectuar la electroforesis (5 horas, 180 voltios) con una cantidad de suero de 80 mm. tiras.

Secar las bandas al calor.

Entonces están listas para la lectura.

PREPARACION DE EXTRACTOS DE LIPIDOS SERICOS Y HUMORALES

- 1º) Se toman 2 ml. suero y se precipitan en matraz de 100 ml. , con 32 ml. de cloroformo-metanol (1:1).
- 2º) Evaporar a sequedad en rotavapor y enfriar a temperatura ambiente.
- 3º) Diluir con 50 ml. de cloroformo.
- 4º) Filtrar y agitar con 15 ml. de agua destilada.
- 5º) Se deja en reposo durante unas horas.
- 6º) Se separan 25 ml. de la capa inferior (clorofórmica) que contiene los lípidos.
- 7º) Se evapora a sequedad.
- 8º) Se redissuelve en 0,5 ml. de cloroformo-metanol (1:1).

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

### MATERIAL Y METODOS.-

#### 1) Preparación de la capa fina:

Se toma 50 gr. de silicagel G (Merck) y se añade 100 ml. de agua destilada en un frasco Erlenmeyer. Se agita durante 2 min. y medio exactamente, con objeto de tener condiciones idénticas en todos los experimentos. Esta mezcla se vierte en la cámara de un extensor Desaga que se hace deslizar sobre 5 placas de vidrio (limpiadas con agua y alcohol muy escrupulosamente) 20x20, apoyadas sobre un soporte especial para este método. Existe un aparato Stratonat que hace las placas de una forma automática.

Se pueden emplear otros tipos de capa fina, como la poliamida ó el silicagel de diversa composición (H, GF<sup>254</sup> HF<sup>254</sup> Silanizado).

Para la cromatografía en fase invertida, si empleamos el nitrato de plata en lugar de mezclar el silicagel con agua, se mezcla con una solución acuosa de nitrato de plata al 12,5%, conviene en este caso limpiar rápidamente el extensor.

La impregnación con undecano se verifica después de preparada la placa como habitualmente. Se sumerge durante medio min. la placa en silicagel en un recipiente que contiene una solución de undecano al 5% en éter de petróleo, dejándose a continuación evaporar el éter de petróleo.

Las placas preparadas deben ser "activadas", es decir, deshidratadas, por lo cual se introducen en una estufa de desecación a 130° durante 30 min. Si estas placas no se emplean al poco rato de ser activadas y enfriadas, deben introducirse en un recipiente que contenga un adsorbente de humedad ambiental (Silicagel azul).

Pueden usarse, asimismo, placas preparadas ó láminas de aluminio sobre las que se ha depositado el silicagel (Cromatoplaças ó cromatofolios).

#### 2) Preparación de extractos lipídicos:

a) Suero: 2 ml. de suero se precipitan en matraz aforado de 50 ml. con 32 ml. de cloroformo-metanol (1-,) llegando a ebullición unos momentos. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se diluye a 50 ml. de agua destilada. Se deja en reposo una hora. Se separan 25 ml. de la capa inferior (cloroformica) que contiene los lípidos. Se evapora a sequedad con rotavapor (Buchl) y se disuelve en 0,5 ml. de cloroformo-metanol. Se aplican sobre la placa 10 a 20 micras.

## DESARROLLO CROMATOGRÁFICO

### a) Separación de lípidos neutros.

La separación de lípidos en clases, es decir éster de colesterol, triglicéridos, colesterol libre, ácidos grasos libres y fosfolípidos, se consigue mediante múltiples sistemas. Nosotros hemos empleado dos sistemas distintos.

Una vez preparada la placa cromatográfica y habiendo dispuesto los extractos a 2 cm. del borde inferior, se prepara la cámara cromatográfica, p. ej. Whatmann 2 MM con objeto de conseguir una saturación total. Añadiendo los solventes que habitualmente son, cloroformo y benceno (3:2) unos 100 c.c. se espera que se sature la cámara y acto seguido se introduce la placa en su interior. Se espera que el frente del disolvente recorra 15 cm. (Se tarda aproximadamente 45 min.) secándose la placa cromatográfica y esperando que se seque a temperatura ambiente ó todavía mejor a 70°C durante 30 min. Se deja enfriar y la placa está dispuesta para el revelado, que describiremos en el próximo apartado.

Mediante este sistema se separan de arriba a abajo los siguientes compuestos, indicando los Rf x 200 y los cm. recorridos.

Esteres de colesterol (77:12,4/16).

Triglicéridos (21:3,5/16)

Colesterol libre (58:9,3/16)

Ácidos grasos libres (6:1,1/16)

Fosfolípidos (0:0/16)

Ocasionalmente por encima de los ésteres de colesterol se separa otra fracción que se ha demostrado que se trata del-escualeno. Así mismo en ocasiones se separan los mono y diglicéridos y ésteres metílicos.

Hemos ensayado en algunos casos la cromatografía bidimensional empleando en los desarrollos el mismo disolvente.

Otro sistema que ocasionalmente hemos usado (Malins y Mangold), es la mezcla de éter etílico, éter de petróleo y ácidos acético (10:90:1). Recorrido 15 cm. Se separan las siguientes fracciones:

- Esteres de colesterol
- Triglicéridos
- Ácidos grasos libres
- Colesterol
- Mono y diglicéridos
- Fosfolípidos

Cayton, Mac Murray y Morrison (1970) estudiaron las combinaciones de solventes para la separación de extractos lipídicos, consiguieron las siguientes separaciones sobre Silicagel G:

Con dietileter-benceno-etanol-ácido-acético (40:50:2:0,2), secar y un nuevo desarrollo en la misma con dietileter-hexano (6:94).

- Esteres de colesterol
- Triglicéridos
- 1,3 Diglicérido
- 1,2 Diglicérido
- Acidos grasos libres
- Acil-monogalactosildiglicérido
- 2 monoglicérido
- 6-O-Acilesterilglicérido
- Glucolípidos polares
- Fosfoglicéridos

Una separación semejante se consigue en un desarrollo con cloroformo-acetona-metanol-ácido acético (73:25:1,5:0,5).

Una mayor separación de las fracciones polares la consiguen Ulayton, Mac Murray y Morrison con cloroformo-acetona-agua (30:60:2).

Sachs y Wolfman recomiendan un primer desarrollo para los lípidos séricos con N propanol NH<sub>4</sub>OH (2/1). Recorrido 3 cm. y un segundo recorrido con cloroformo-benceno (3/2).

b) Separación de ésteres de colesterol.

Los ésteres de ácidos grasos de colesterol se separan entre sí mediante 4 eluciones de 10 cm. cada vez y secado con aire caliente después de cada una, con éter de petróleo (60-80) y cloroformo 90/10. El tiempo de cada elución es de 25 min.

Se preparan las siguientes ésteres:

- Colesterina-estearato 3-4 cm.
- Colesterina oleato 3 cm.
- Colesterina linoleato 2-3 cm.
- Colesterina linoleato
- Colesterina araquido-
- nato. 1-2 cm.

La cantidad que aplicaremos como prueba es de 2 y 5 lambdas.

c) Separación de fosfolípidos séricos.

Se aplica a la placa 20 y 30 lambdas del extracto sérico. Segundo recorrido 10 cm. con secado intermedio, con cloroformo-metanol-agua (65:25:4). Así mismo hemos

empleado el sistema que recomienda Carton y cols. (1968), cloroformo-metanol-agua, ácidos acético (60:30:6:3). Recorrido 15 cm. que tarda unos 30 min. en realizarse

En el suero se separan cefalina, lecitina, esfingomielinas y lisolecitina.

- Cefalina..... 60(8,4/13)
- Lecitina..... 37(5,25/14)
- Esfingomielinas..... 25(3/14)
- Lisolecitina..... 23(3,3/14)

d) Separación de triglicéridos.

La separación de triglicéridos sí se consigue por medio de la cromatografía en fase invertida, impregnando la capa fina (Kieselque ó Silicagel) con diversos agentes (tetradecano, solución etérea, aceite de parafina, aceite de silicona, solución de nitrato de plata).

Nosotros hemos ensayado la impregnación de Silicagel con nitrato de plata al 12,5%. En lugar de mezclar el silicagel con agua lo mezclamos con la solución nitrato de plata. Conviene tener presente las placas se estropean fácilmente. Encima de la placa se hace un depósito de 40 lambdas de extracto de suero. Como disolvente se emplea benceno. Recorrido 15 cm. Tiempo 15,20 min. Con este método se consigue la separación de 5-6 compuestos que por el momento no hemos conseguido identificar.

Michaels y cols. (1962) separan en suero los siguientes triglicéridos:

- Trilinoleína
- Oleodilinoleína
- Linoleodileína
- Triolina
- Triglicérido no identificado.

Hofmann (cit. por Malins) consigue la separación de 1 y 2 monoglicéridos mediante capa fina de Hidroxitapatita, empleando como solvente metilpropilcetona a 10°C.

e) Separación de ácidos grasos.

El método ideal para la separación de ácidos grasos es el cromatográfico en fase gaseosa. Cuando se dispone de este instrumento puede emplearse la cromatografía en capa fina sobre silicagel silanizado.

Bennett y Hofmann (cit. por D. Heusser) emplean como disolventes dioxano-ácido fórmico (60:35:5). La separación se consigue por un procedimiento continuo de más de 4 horas de duración. Tinción con solución ácida, posteriormente la placa en atmósfera de amoníaco durante algunos minutos. Con este método se consigue separar los ácidos esteárico, palmítico, mirístico, láurico, caprílico y caprónico.

Los pares críticos no se separan.

Mangold y Hammerack, emplean la formación de derivados acetoxi-mercuri-metoxi, para la separación de ácidos grasos hacen reaccionar la mezcla de lípidos con acetato mercuríco y metanol, fijándose en los dobles enlaces de acuerdo con la ecuación.

El desarrollo cromatográfico se verifica sobre silicagel G con los siguientes solventes, primero:

- Eter de petróleo 4
- Dietileter 1

segundo desarrollo en la misma dirección:

- Npropanol 100
- Acido acético

Emplean como indicador s-difenil-carbazona y vapor de yodo.

Privet y cols. (1963) fraccionan los ésteres de colesterol metílicos de los ácidos grasos derivados de los fosfolípidos del hígado de la rata, según su grado de insaturación. Emplean una capa de silicagel impregnada con nitrato de plata.

El solvente consta de:

- Eter de petróleo 80
- Dietileter 20

Indicador 2,7 diclorofluoresesina, con esta técnica se separan perfectamente, etiloleato, metilinooleato, metilaraquidonato.

MÉTODOS DE DETECCIÓN.

Los métodos de revelado para la cromatografía en capa fina aplicados a los lípidos, son muy numerosos.

Nosotros empleamos la tinción con ácido fosfomolibdico al 10%. Una vez seca la placa cromatográfica, se coloca en una campana donde, mediante un pulverizador, (pera de goma, aparato compresor ó jetpak) se hacen varias pasadas sobre la placa con la solución de ácidos fosfomolibdico; a continuación se introduce en la estufa 110-130°C durante 10-15 min. apareciendo los lípidos de color negro, con el fondo amarillo. Puede decolorarse el fondo introduciendo la placa en una cámara que contenga vapores de amoníaco durante unos minutos.

Las asperciones con solución 2,7 diclorofluoresceina y con rodamina B (0,5%), permiten la visibilidad de los lípidos, bajo la luz ultravioleta, Este método tiene interés en la cromatografía preparativa, para aislar un grupo de lípidos determinado y posteriormente recromatografiarlo en capa fina ó mejor con el cromatógrafo de gases.

VALORACION CUANTITATIVA DEL CROMATOGRAMA.

La cromatografía en capa fina aplicada al estudio de los lípidos es un sistema extraordinariamente interesante por cuanto permite un estudio cuantitativo de las diversas clases de lípidos en poco tiempo, en tanto la aplicación de métodos químicos llevaría un número elevado de horas. Sin embargo, el método cromatográfico es por excelencia cualitativo y semicuantitativo si se trabaja en condiciones standard. Permite hallar el aumento ó disminución de una fracción determinada. Nosotros acostumbramos a emplear las denominaciones siguientes:

- Cromatograma normal es aquél que comparado con un control conocido (Metrix, Monitrol I ó pool de sueros normales), presenta la misma intensidad y el mismo diámetro de las manchas lipídicas.
- Discreto aumento, notable aumento ó gran aumento de una ó más fracciones, referido siempre al control normal.
- Disminución de una ó más fracciones, es un término referido a la disminución de diámetro y de la intensidad de color de una ó más manchas.

Como se desprende de los dicho, este tipo de valoración es muy subjetiva. Ahora bien, después de una dilatada experiencia en la valoración de los cromatogramas creemos que el criterio expuesto si la valoración la realiza el mismo individuo y esta hecho el cromatograma en las mismas condiciones, el criterio es válido.

Algunas veces hemos comprobado que en un cromatograma sérico valorado como normal, la cantidad absoluta de lípidos valorada químicamente está aumentada ó disminuida. Actualmente, tenemos el criterio de que la cromatografía en capa fina aplicada al estudio de los lípidos séricos, es un método excelente como "Screening" de dislipemias, pero cuando interesa conocer exactamente los diversos parámetros lipídicos debe recurrirse a métodos químicos y cromatográficos en fase gaseosa. A pesar de los dicho, estamos convencidos del valor del método cromatográfico, del que deben conocerse sus limitaciones y sus posibles causas de error.

En la valoración, el parámetro cromatografía, lo hemos reducido a normal, aumentada ó disminuida dado que lo acompañamos de la cuantificación de los demás valores lipídicos.

A) ..... Esteres Saturados  
 ..... Esteres Monoenoicos  
 ..... Esteres Dienuicos  
 ..... Esteres Trienuicos  
 ..... Esteres Polienuicos

..... Colesterol Esterificado

B)

..... Triglicéridos

..... Acidos Grasos Libres

..... Colesterol Libre

C)

..... Cefalina

..... Lecitina

..... Esfingomielinas

..... Lisolecitina

Cromatografía de: A) Esteres de Colesterol. B) Lípidos Neutros. C) Fosfolípidos, de extracto lipídico de suero.

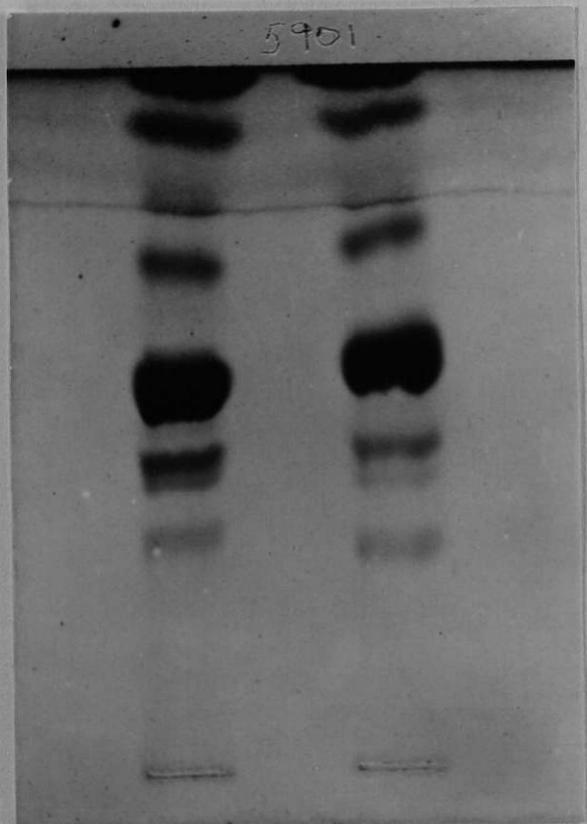
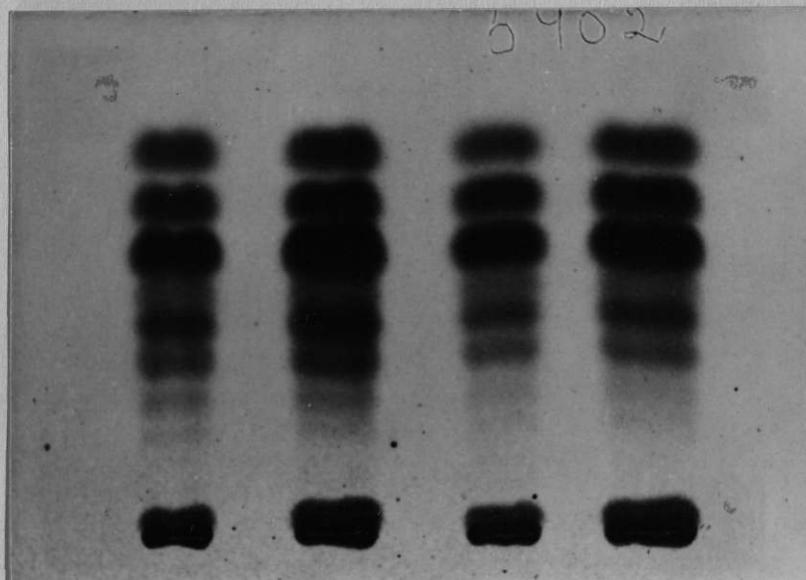
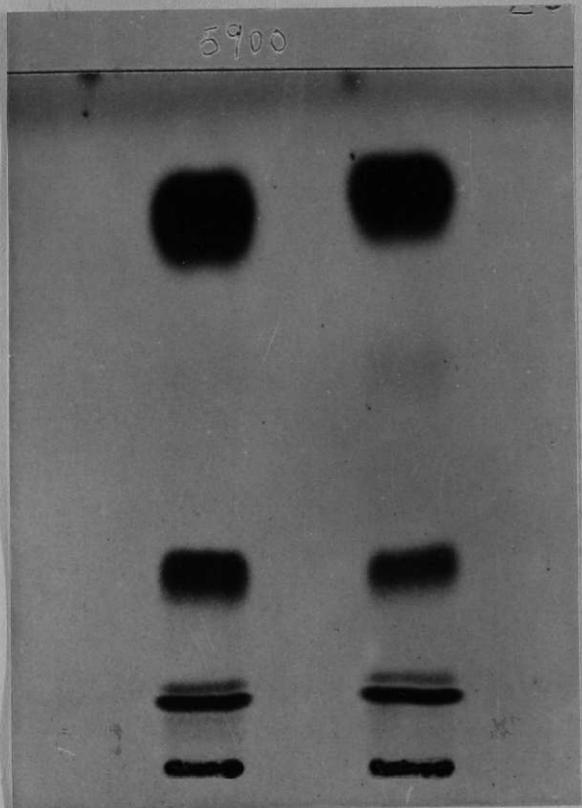
Adsorbente: Silicagel G.

Solventes: A) Eter de Petróleo-Cloroformo.

B) Eter de Petróleo-Eter Etilico-Acido Acético.

C) Cloroformo-Metanol-Acético-Agua.

Tinción: Acido Fosfomolibdico al 10 % .



CROMATOGRAFIA de: Esteres de colesterol, lípidos neutros y Fosfolípidos de extracto lipídico de suero.

Adsorbente: Silicagel G.

Solventes: Eter de petróleo-cloroformo

Eter de petróleo-éter etílico-ácido acético.

Cloroformo-metanol-acético-agua

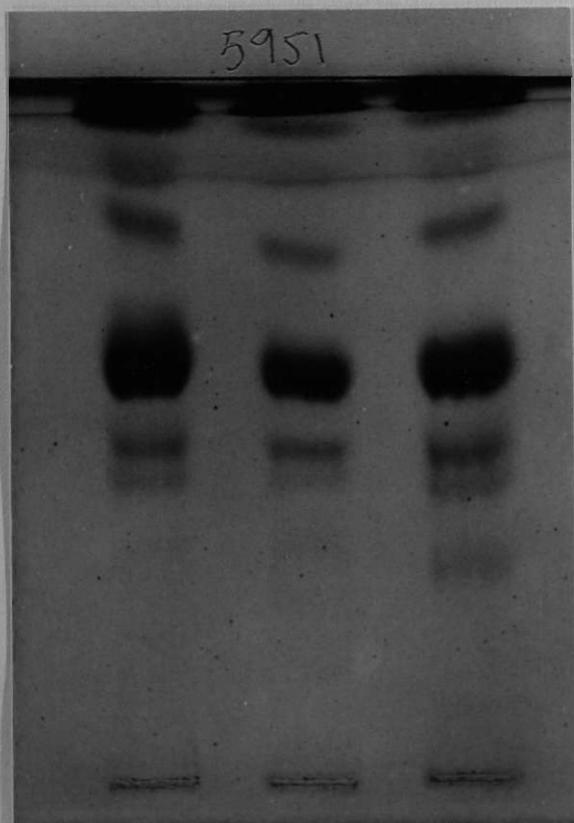
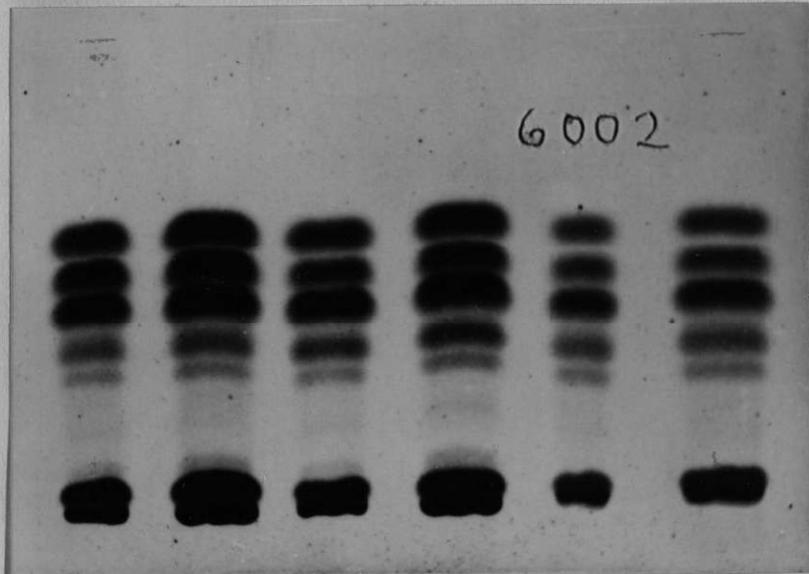
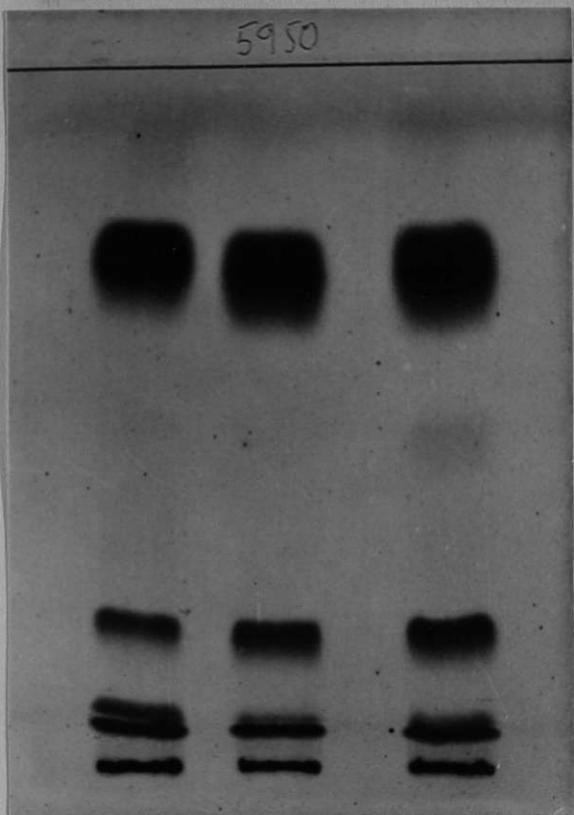
Tinción: Acido fosfomolibdico al 10%.

**COMENTARIO:**

Discreto aumento de los ésteres de colesterol y triglicéridos, discreto aumento de ésteres monoenoicos y dienoicos y discreto aumento de las esfingomielinas y lisolecitina.

**DIAGNOSTICO:**

Arterioesclerosis.



CROMATOGRAFIA de: Esteres de colesterol, Lípidos neutros y Fosfolípidos de extracto lipídico de suero.

Adsorbentes: Silicagel G.

Solventes: Eter de petróleo-cloroformo.

Eter de petróleo-éter etílico-ácido acético.

Cloroformo-metanol-acético-agua

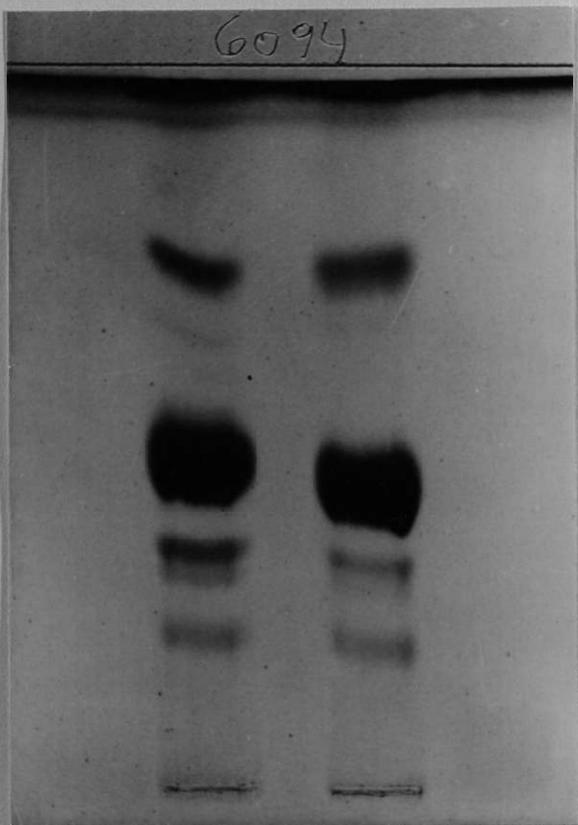
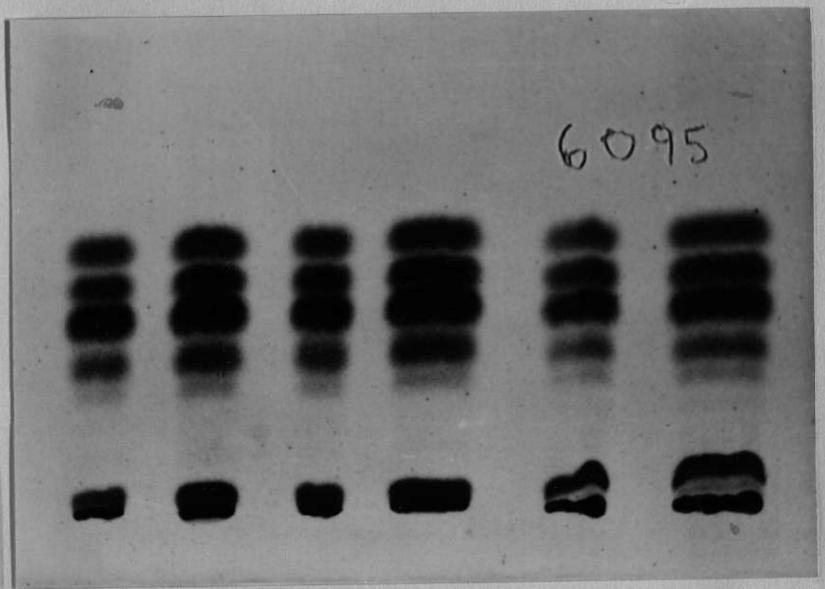
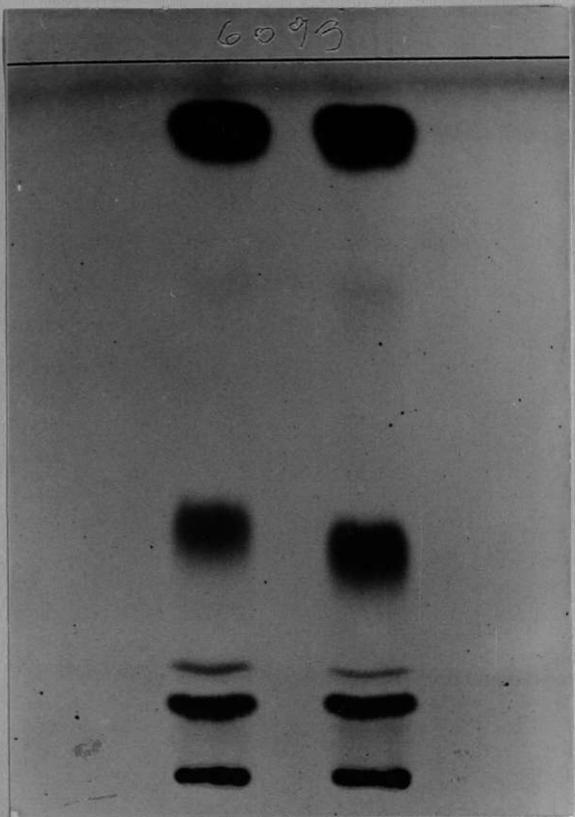
Tinción: Acido fosfomolibdico al 10%.

COMENTARIO:

Cromatograma normal, discreto aumento de los ésteres saturados, monoenoicos y dienoicos y cromatograma normal.

DIAGNOSTICO:

Diabetes.



CROMATOGRAFIA de: Esteres de colesterol, Lípidos neutros y Fosfolípidos de extracto lipídico de suero.

Adsorbente: Silicagel G.

Solventes: Eter de petróleo-cloroformo.

Eter de petróleo-éter etílico-acido acético.

Cloroformo-metanol- acético-agua.

Tinción: Acidos fosfomolibdico al 10%.

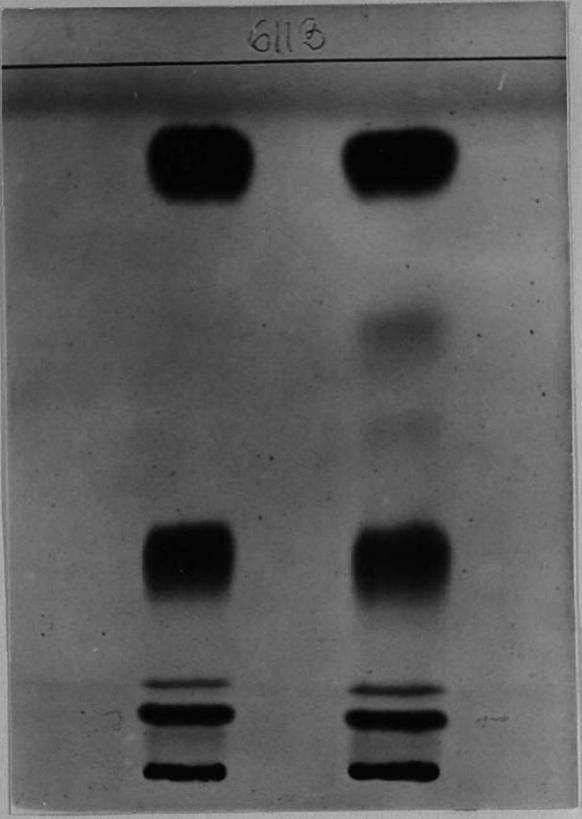
COMENTARIO:

Cromatograma normal, discreto aumento de lecitina y esfingomielinas y cromatograma normal.

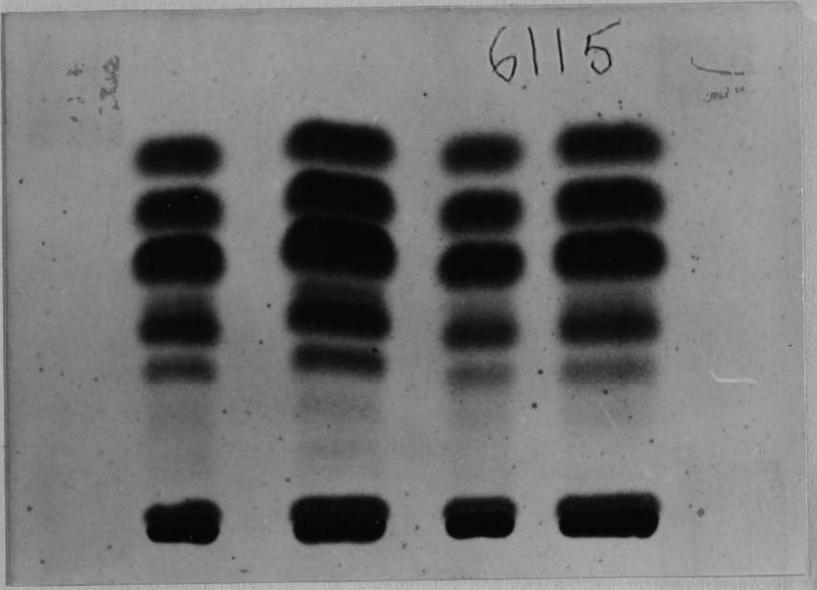
DIAGNOSTICO:

Arterioesclerosis.

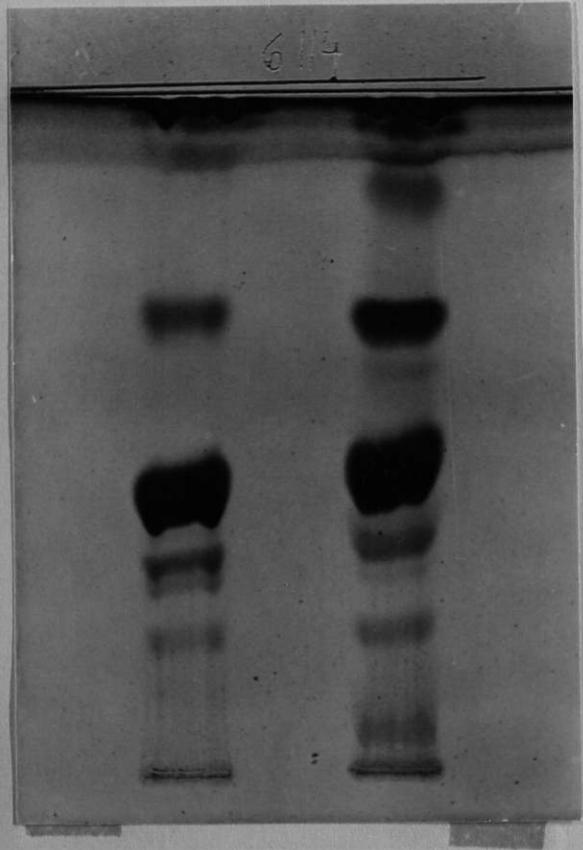
6113



6115



6114



**CROMATOGRAFIA** de: Esteres de colesterol, Lípidos neutros y fosfolípidos de extracto lipídico de suero.

**Adsorbente:** Silicagel G.

**Solventes:** Eter de petróleo-cloroformo  
Eter de petróleo-éter etílico-ácido acético.

Cloroformo-metanol-acético-agua.

**Tinción:** Acido fosfomolibdico al 10%.

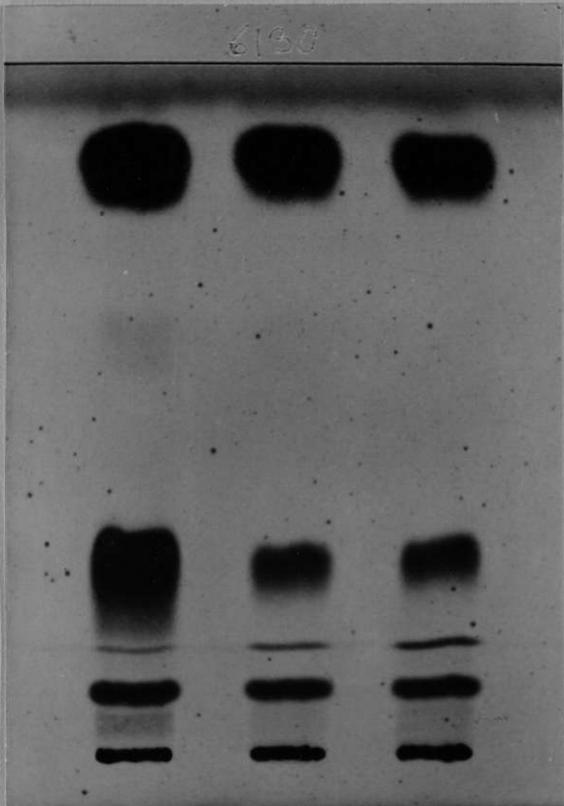
**COMENTARIO:**

Cromatograma normal, Aumento de los ésteres monoenoicos y dienoicos y cromatograma normal.

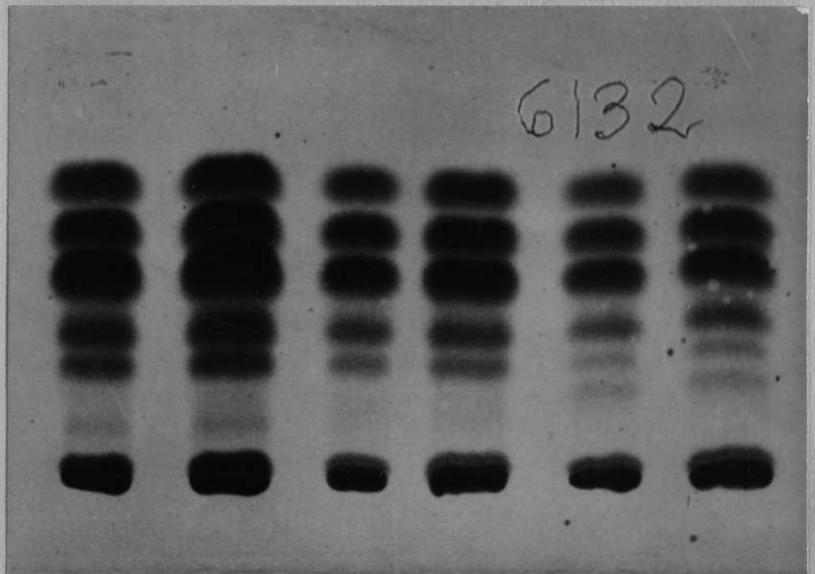
**DIAGNOSTICO:**

**Arterioesclerosis.**

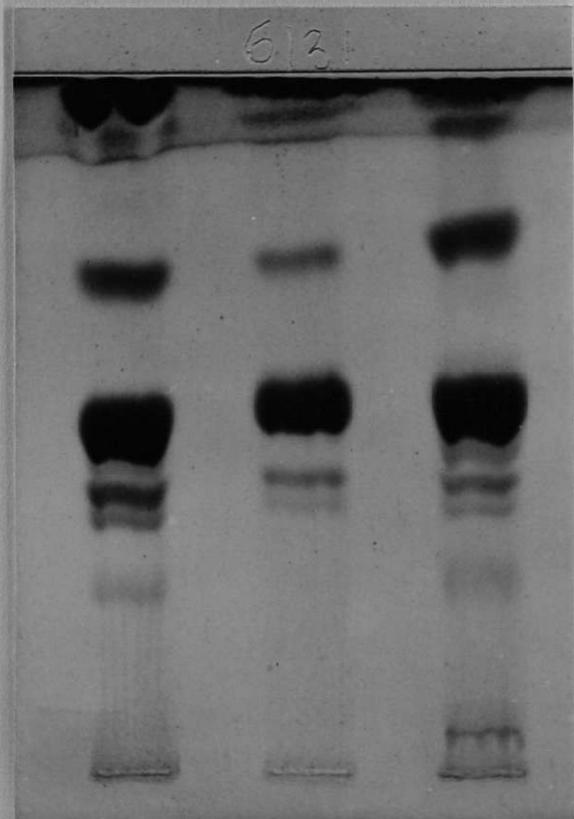
6131



6132



613



CROMATOGRAFIA de: Esteres de colesterol, Lípidos neutros y Fosfolípidos de extracto lipídico de suero.

Adsorbente: Silicagel G.

Solventes: Eter de petróleo-cloroformo

Eter de petróleo-éter etílico-ácido acético

cloroformo-metanol-acético-agua.

Tinción: Ácido fosfomolibdico al 10%.

**COMENTARIO:**

Cromatograma normal, discreto aumento de los ésteres monoenoicos y dienoicos y cromatograma normal.

**DIAGNOSTICO:**

Arterioesclerosis.