

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Estudios de membrana plasmática de plaquetas humanas :  
aislamiento y caracterización de la glicoproteína IIIa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Teresa Eirin Pena**

DIRECTOR:

**José González Rodríguez**

Madrid, 2015

TP  
1982  
070

María Teresa Eirin Pena



x - 58 - 011801 - 8

ESTUDIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE PLAQUETAS HUMANAS.  
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOPROTEINA III<sub>a</sub>

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



© M<sup>a</sup> Teresa Eirin Pena  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-6249-1982

La presente tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Física "Rocasolano" del C.S.I.C., bajo la dirección del Dr. D. José González Rodríguez, al que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Deseo también expresar mi agradecimiento:

A los Drs. D. Armando Albert, Dña. Teresa Díaz, D. José L. Saiz y Dña. Pilar Usobiaga su gran interés y ayuda.

Al Dr. D. J.L. Navarro, Jefe del Servicio de Hematología del Centro Especial "Ramón y Cajal", su gran colaboración en el suministro de concentrados de plaquetas.

A Dña. Consuelo Martín y Dña. Irene Romo su excelente ayuda técnica.

Al Profesor D. Angel Martín Municio el haber aceptado ser el ponente de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, y a todos los que de una u otra forma han colaborado para que este trabajo haya podido realizarse.

I N D I C E

|   |     |
|---|-----|
| <u>AGRADECIMIENTOS</u> .....  | I   |
| <u>INDICE</u> .....   | II  |
| <u>ABREVIATURAS</u> .....   | VII |
| <u>CAPITULO I. INTRODUCCION, ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO</u> .....   | 1   |
| I.1. <u>INTRODUCCION</u> .....  | 2   |
| I.1.1. <u>Aspectos generales de interés en el estudio de la estructura y función de membranas plasmáticas</u> ..... | 2   |
| I.2. <u>ALGUNOS FENOMENOS DE SUPERFICIE CELULAR EN COAGULACION Y HEMOSTASIA</u> .....                               | 4   |
| I.2.1. <u>Interacción plaqueta-subendotelio: adhesión plaquetaria</u> .....   | 10  |
| I.2.2. <u>Activación de zimógenos del sistema de coagulación en la superficie de plaqueta activada</u> .....        | 12  |
| I.2.3. <u>Interacción entre plaquetas activadas. Agregación plaquetaria</u> .....                                   | 15  |
| I.2.4. <u>Reacción de liberación: degranulación</u> .....   | 17  |
| I.2.5. <u>Interacción agregado de plaquetas-fibrina; retracción del coágulo y sistema de contracción</u> .....      | 19  |

|   |    |
|---|----|
| I.3. MEMBRANA PLASMÁTICA DE PLAQUETA HUMANA.  |    |
| GLICOPROTEINAS .....  | 21 |
| I.3.1. <u>Origen de la membrana plasmática de plaquetas</u> .....   | 21 |
| I.3.2. <u>Antecedentes</u> .....  | 22 |
| I.3.2.1. <u>Estructura de glicoproteínas</u> .....  | 24 |
| I.3.2.2. <u>Función de las glicoproteínas</u> .....   | 29 |
| I.3.3. <u>Interés de la membrana plasmática de plaquetas humanas como material de estudio. Trascendencia de su conocimiento en coagulación y hemostasia y en su patología</u> ..... | 32 |
| I.4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....  | 33 |
| I.4.1. <u>Objetivos</u> .....   | 35 |
| I.4.2. <u>Plan de trabajo</u> .....   | 36 |
| I.5. BIBLIOGRAFIA .....   | 38 |
| CAPITULO II. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....  | 43 |
| II.1. FUENTE Y PREPARACION DE PLAQUETAS .....   | 44 |
| II.2. METODO DE AISLAMIENTO DE MPPH .....   | 45 |
| II.3. TECNICAS DE CARACTERIZACION DE MPPH .....   | 46 |
| II.3.1. <u>Determinación de actividad enzimática.</u><br><u>Fosfodiesterasa</u> .....   | 46 |
| II.3.2. <u>Determinación de proteínas</u> .....   | 49 |
| II.3.3. <u>Extracción de lípidos</u> .....  | 49 |
| II.3.4. <u>Determinación de fósforo</u> .....   | 50 |
| II.3.5. <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u><br><u>conteniendo SDS (SDS-PAGE)</u> .....   | 50 |

|  |    |
|--|----|
| II.4. SOLUBILIZACION DE MPPH .....   | 53 |
| II.4.1. <u>Métodos químicos. Detergentes</u> .....                               | 53 |
| II.4.2. <u>Métodos físicos. Ultrasonidos</u> .....                               | 54 |
| II.5. TECNICAS DE PURIFICACION DE GP IIIa .....                                  | 54 |
| II.5.1. <u>Solubilización de los sedimentos de</u><br><u>sonicación</u> .....    | 54 |
| II.5.2. <u>Cromatografía de exclusión</u> .....                                  | 54 |
| II.5.3. <u>Cromatografía de afinidad</u> .....                                   | 56 |
| II.5.3.1. Activación de Sepharosa con<br>CNBr y su unión a Con A .....           | 57 |
| II.6. TECNICAS DE CARACTERIZACION DE GP IIIa .....                               | 58 |
| II.6.1. <u>Preparación de la muestra previamente</u><br><u>al análisis</u> ..... | 58 |
| II.6.2. <u>Análisis de aminoácidos</u> .....                                     | 59 |
| II.6.3. <u>Análisis de azúcares</u> .....  | 59 |
| II.6.3.1. Análisis colorimétricos .....  | 59 |
| A. Análisis de hexosas .....   | 59 |
| B. Análisis de hexosaminas .....   | 60 |
| C. Análisis de ácidos siálicos .   | 60 |
| II.6.3.2. Determinación de hexosas indivi-<br>duales por cromatografía gaseosa.  | 60 |
| II.6.4. <u>Análisis de SDS ligado</u> .....                                      | 61 |
| II.6.5. <u>Determinación del volumen específico</u><br><u>parcial</u> .....      | 62 |
| II.6.6. <u>Determinación de coeficientes de</u><br><u>sedimentación</u> .....    | 62 |

|   |     |
|---|-----|
| II.6.7. <u>Microscopía electrónica</u> .....  | 63  |
| II.6.8. <u>Espectrofotometría de absorción y emisión.</u>                                 | 64  |
| II.7. BIBLIOGRAFIA .....  | 65  |
| CAPITULO III. <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u> .....                                      | 68  |
| III.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MPPH .....  | 69  |
| III.1.1. <u>Aislamiento</u> .....   | 69  |
| III.1.2. <u>Caracterización química</u> .....   | 69  |
| III.1.3. <u>Caracterización ultraestructural</u> .....                                    | 70  |
| III.1.4. <u>Caracterización electroforética</u> .....                                     | 70  |
| III.2. SOLUBILIZACION DE MPPH .....   | 81  |
| III.2.1. <u>Solubilización por detergentes</u> .....                                      | 81  |
| III.2.2. <u>Solubilización por ultrasonidos</u> .....                                     | 84  |
| III.3. AISLAMIENTO DE LA GP IIIa .....  | 90  |
| III.3.1. <u>Cromatografía de exclusión</u> .....  | 90  |
| III.3.2. <u>Cromatografía de afinidad</u> .....   | 98  |
| III.4. CARACTERIZACION DE LA GP IIIa .....  | 101 |
| III.4.1. <u>Criterio de pureza y masa molecular</u><br><u>relativa por SDS-PAGE</u> ..... | 101 |
| III.4.1.1. SDS-PAGE en tampón fosfatos<br>y geles del 5% .....                            | 101 |
| III.4.1.2. SDS-PAGE en tampón Tris-gli-<br>cina y geles del 7% .....                      | 105 |
| III.4.2. <u>Composición química</u> .....   | 105 |
| III.4.2.1. Composición de aminoácidos .   | 109 |
| III.4.2.2. Composición de azúcares ....   | 109 |
| III.4.2.3. Contenido en fósforo y SDS .   | 109 |

|  |     |
|--|-----|
| III.4.2.4. Composición centesimal .....  | 110 |
| III.4.3. <u>Volumen específico parcial de la</u><br><u>GP IIIa</u> .....   | 110 |
| III.4.4. <u>Identificación de la glicoproteína ais-</u><br><u>lada como la GP IIIa de MPPH</u> .....   | 110 |
| III.4.5. <u>Espectrofotometría de absorción y emi-</u><br><u>sión de cromóforos intrínsecos. Deter-</u><br><u>minación del coeficiente de extinción</u><br><u>aparente a 280 nm en SDS al 0,1%</u> ..... | 111 |
| III.4.6. <u>Estudios de ultracentrifugación</u><br><u>analítica</u> .....  | 117 |
| III.5. BIBLIOGRAFIA .....  | 119 |
| CAPITULO IV. <u>DISCUSION</u> .....  | 120 |
| IV.1. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA MPPH UTILIZADO.<br>GLICOPROTEINAS .....  | 121 |
| IV.2. SOLUBILIZACION DE MPPH Y FRACCIONAMIENTO DE<br>LOS COMPONENTES SOLUBILIZADOS. AISLAMIENTO<br>DE LA GP IIIa .....   | 125 |
| IV.3. COMPOSICION QUIMICA Y TAMAÑO DE LA GP IIIa .....   | 130 |
| IV.4. HACIA UN POSIBLE MODO DE INSERCIÓN Y UNA<br>PROBABLE FUNCION DE LA GP IIIa EN LA MPPH .....  | 136 |
| IV.5. BIBLIOGRAFIA .....   | 140 |
| CAPITULO V. <u>CONCLUSIONES</u> .....  | 145 |

ABREVIATURAS

- APA - Lectina de Abrus precatorius.  
BSA - Seroalbúmina bovina.  
CNBr - Bromuro de cianógeno.  
Con A - Concanavalina A.  
d - Densidad.  
DchNa - Desoxicolato sódico.  
DD<sup>125</sup>ISA - Acido <sup>125</sup>I diazo-di-iodosulfanílico.  
ε - Coeficiente de extinción.  
EDTA - Acido etilendiaminotetraacético.  
Gal - Galactosa.  
Glc - Glucosa.  
GP - Glicoproteína.  
GPP - Glicopéptido.  
LCA - Lectina de Lens culinaris.  
λ - Longitud de onda.  
Man - Manosa.  
α-MDG - α-metil-D-glucosa.  
α-MDM - α-metil-D-manosa.  
2-ME - 2-mercaptoetanol.  
MPPH - Membrana plasmática de plaqueta humana.  
NANA - Acido N-acetil neuramínico.  
PSA - Lectina de Pisum sativum.  
RCA - Lectina de Ricinus Communis.

- VIII -

SDS - Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo  
SDS.

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano.

WGA - Lectina de germen de trigo.

**CAPITULO I.- INTRODUCCION, ANTECEDENTES**  
**Y PLANTEAMIENTO**

## I.1. INTRODUCCION

En la presente tesis tratamos de exponer nuestros intereses e investigaciones sobre la estructura y función del sistema de membrana plasmática de plaquetas, sistema muy peculiar tanto desde el punto de vista de su origen como desde el de su rica y variada función.

En este primer capítulo comenzaremos con la visión que a nuestro entender se tiene hoy sobre la estructura y función de membranas plasmáticas, en general. Posteriormente tratamos de algunos fenómenos de superficie celular en coagulación y hemostasia, para después ocuparnos del estado actual de nuestros conocimientos sobre membrana plasmática de plaqueta humana, señalando el interés y la trascendencia de la búsqueda de este conocimiento.

Finalmente, terminaremos este capítulo con la exposición de nuestros objetivos y plan de trabajo en la presente tesis.

### I.1.1. Aspectos generales de interés en el estudio de la estructura y función de membranas plasmáticas

Los fosfolípidos y demás lípidos en su búsqueda por su propio equilibrio termodinámico en agua, han creado un tipo de estructura, la bicapa lipídica (1), que impide el equilibrio de la mayoría de las sustancias hidrosolubles entre los compartimentos que ella separa. Estas fueron la primera estructura y la primera función que se reconocieron en membranas biológicas. Pronto

se puso de manifiesto la necesidad que las células tienen de controlar esta barrera para desarrollar los aspectos vitales de su funcionamiento: acceso de metabolitos para fuente de energía; acceso de unidades básicas para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; canales iónicos para la transmisión de impulsos eléctricos; lugares de reconocimiento en la superficie extracelular para la organización de estructuras supracelulares, reconocimiento de hormonas, neurotransmisores, etc; canales de comunicación intercelular; sistemas de mantenimiento de gradientes electroquímicos; secreción de hormonas, enzimas, neurotransmisores, etc.

Así, a la primitiva idea de membrana como límite fueron añadiéndose las funciones propias de las unidades de reconocimiento e interacción específicos con señales físicas y químicas, y posteriormente las unidades acopladas con ellas y responsables de la puesta en marcha de una función específica, como respuesta a aquel reconocimiento.

Ejemplo de estos sistemas de unidades de reconocimiento acopladas a unidades de control de función tenemos en los receptores químicos, los receptores sensoriales, los determinantes de especificidad antigénica superficial, las enzimas de superficie, y los sistemas de conversión de energía en el sentido más amplio.

Es obvio el por qué estos sistemas están asentados en el límite citoplasma-medio extracelular, lo que ya no lo es tanto son las limitaciones y las ventajas para la dinámica molecular y por tanto para su función que simultáneamente suponen su

incorporación a estructuras supramoleculares condensadas y para muchos efectos bidimensionales.

En la presente tesis nos vamos a restringir a los sistemas de reconocimiento de señales químicas y de control de función correspondientes, tratando de gradualmente aproximarnos al sistema que nos interesa a nosotros en particular, el que incluye la glicoproteína IIIa de membrana plasmática de plaquetas humanas.

#### I.2. ALGUNOS FENOMENOS DE SUPERFICIE CELULAR EN COAGULACION Y HEMOSTASIA

En este apartado trataremos de dar una visión actual del mecanismo hemostático y la interrelación de los tres sistemas que lo fundamentan: el sistema de coagulación, el sistema vascular y el sistema plaquetario.

La formación del tapón hemostático que impide la pérdida de sangre tras un daño vascular, es uno de los mecanismos de defensa del hombre menos efectistas, precisamente por su alta eficiencia en el control de la hemorragia que puede acontecerle durante los muchos y variados insultos externos a lo largo de su vida y durante acontecimientos fisiológicos tales como el parto y el nacimiento, el ciclo sexual femenino, etc.

Si esta eficiencia es admirable y beneficiosa, todavía lo es más si cabe el perfecto control de este mecanismo, que cuando fracasa por motivos congénitos o adquiridos, puede llevarnos a una tendencia hemorrágica o por el contrario a una trombosis o a una aterosclerosis vascular.

El mecanismo hemostático y su control es el fruto de una

estrecha y complicada interrelación entre tres sistemas fundamentales:

- El sistema de coagulación.
- El sistema vascular.
- El sistema plaquetario.

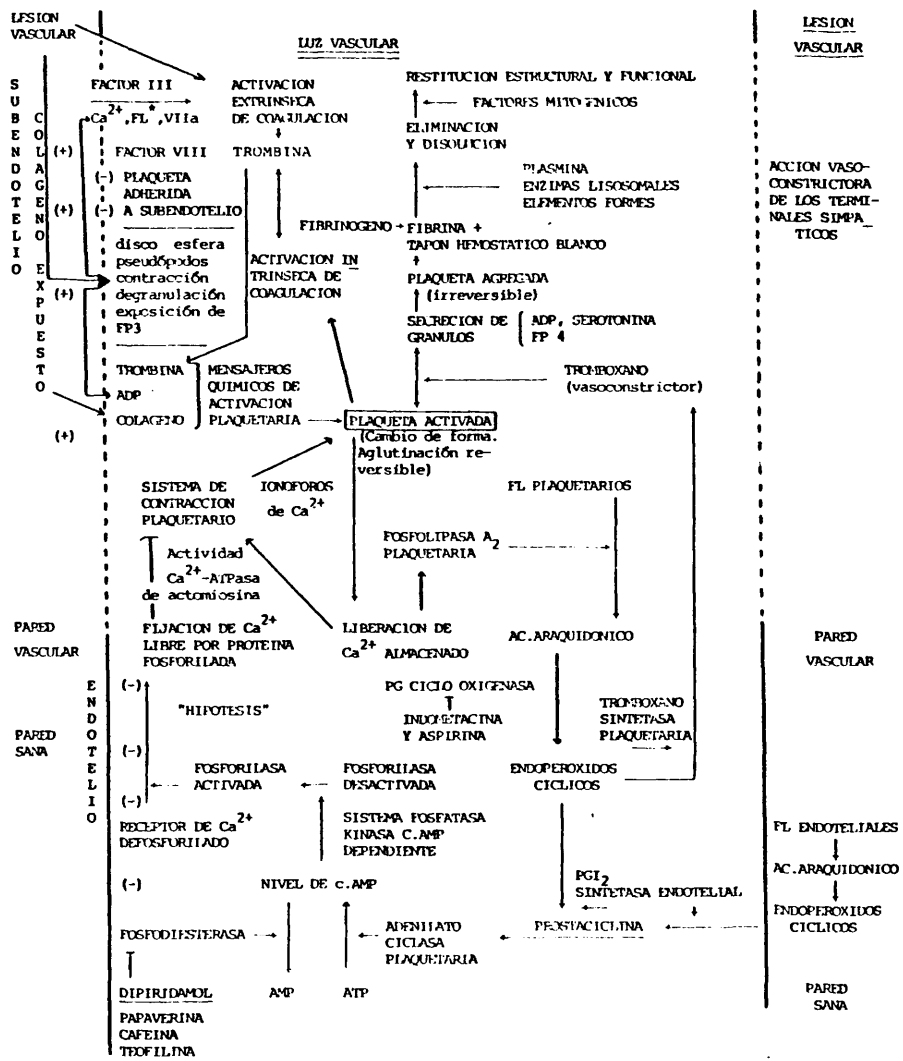
Alteraciones en cualquiera de estos sistemas pueden llevar a defectos en el mecanismo o en el sistema de control de la hemostasia. Se trata de una multitud de factores solubles, tales como factores de coagulación, productos de secreción de gránulos de plaqueta, etc, e insolubles, estos últimos dispuestos fundamentalmente en estructuras supramoleculares, tales como membranas plasmáticas de plaqueta, endotelio vascular, colágeno y subendotelio, etc (Esquemas I y II).

El mecanismo de disparo natural del proceso hemostático es por rotura de la continuidad vascular y consiguiente extravasación de sangre, pero lesiones menores pueden suceder tales como lesión únicamente del endotelio vascular. Estas lesiones ponen en marcha primariamente por un lado la activación extrínseca del sistema de coagulación y por otro la adhesión a subendotelio de una monocapa de plaquetas, y además una acción vasoconstrictora de los terminales simpáticos.

Una vez formadas pequeñas cantidades de  $FX_a$  por activación extrínseca, se forma una pequeña cantidad de trombina (FIIa) que va a facilitar la puesta en marcha de la vía intrínseca de coagulación, así como la activación de plaquetas.

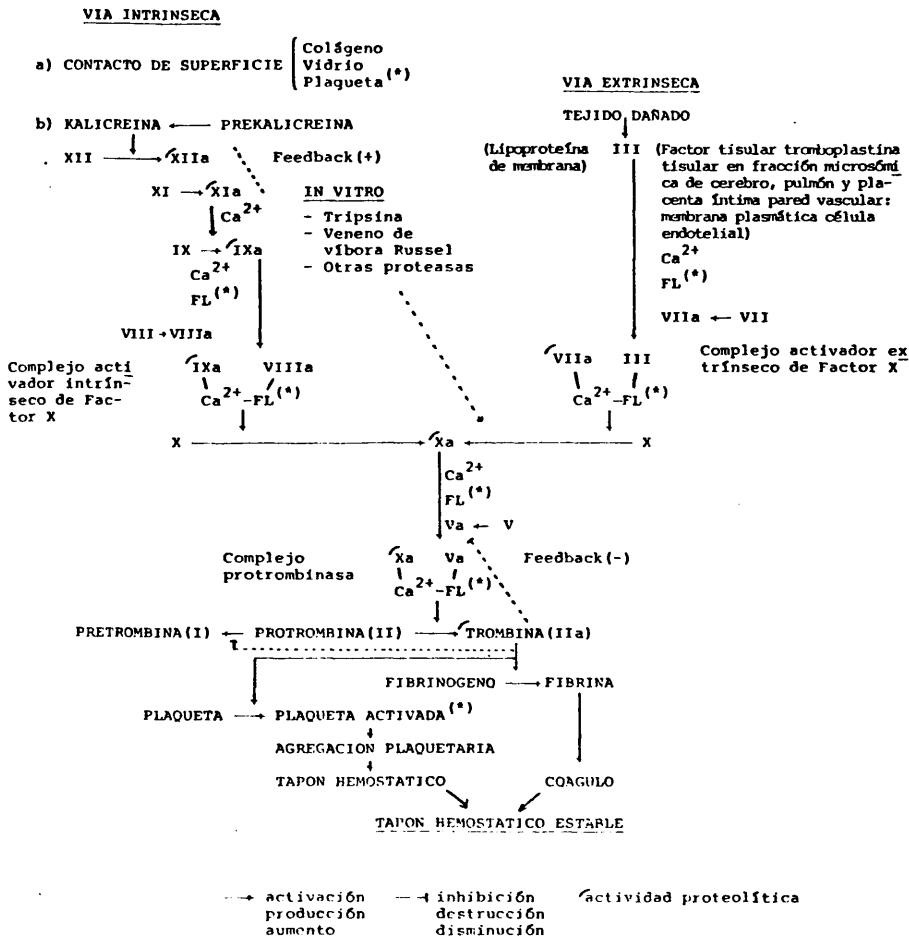
Igualmente, la monocapa de plaquetas adherida a subendotelio se activa, cambia de forma, emite pseudópodos y se degra-

ESQUEMA 1  
ESQUEMA PROVISIONAL DE HEMOSTASIA



**ESQUEMA 2**

Esquema simplificado de interacción de factores de coagulación



nula liberando ADP, serotonina (vasoconstrictor posiblemente) , factor plaquetario 4 (antiheparina),  $Ca^{2+}$ , etc, lo que a su vez va a originar el que otras plaquetas circulantes se activen, se agreguen y se degranulen sobre esta monocapa adherida, y así sucesivamente nuevas capas de plaquetas sobre las anteriormente depositadas. La activación de estas plaquetas y la liberación de más ADP, serotonina, FP4, tromboxano  $A_2$  (potente vasoconstrictor),  $Ca^{2+}$ , factores mitogénicos, enzimas lisosomales, exposición de FP3, etc, junto con la propia lesión endotelial, va a facilitar la puesta en marcha de la vía intrínseca de coagulación y la formación de cantidades mayores de trombina.

De este modo tenemos formado un tapón de plaquetas agregadas y degranuladas total o parcialmente, y el sistema de formación de fibrina disparado. El tapón plaquetario con fibrina o tapón hemostático estable, se contrae y obtura la rotura vascular cerrándose la salida de sangre.

Una vez aquí tienen que ponerse en marcha sistemas que frenen tanto la agregación plaquetaria como la formación de fibrina y el avance del tapón hemostático a lo largo de la luz del vaso más allá de la pared vascular dañada. Finalmente hay que facilitar la reconstrucción de la lesión de la pared, restablecer su continuidad, desechar el tapón hemostático y restablecer la luz vascular y la circulación sanguínea; esto es, una restitución integral de la estructura y función.

Esta descripción fenomenológica y superficial es la expresión de una complicada maquinaria molecular cuya estructura y dinámica está lejos de estar totalmente comprendida. Lógi-

camente, dada la naturaleza mayoritariamente soluble de los factores de coagulación, el conocimiento del mecanismo molecular de coagulación está mucho más desarrollado que el del mecanismo de hemostasia, donde predominan estructuras supramoleculares insolubles, actualmente mucho más difíciles de estudiar, tanto en su aspecto estructural como en su aspecto dinámico.

Si nos fijamos en el Esquema II vemos que hay dos procesos fundamentalmente que hacen intervenir los fosfolípidos, la activación de FX y la activación de protrombina a trombina. La activación de FX se efectúa mediante los complejos activadores extrínseco e intrínseco de FX. La activación de protrombina se hace mediante el complejo protrombinasa.

Los experimentos que han puesto en evidencia la existencia de estos complejos activadores, sugieren que la activación de ambos sistemas intrínseco y extrínseco de coagulación sucede en la superficie de plaqueta mediante interacciones altamente específicas para cada factor de coagulación y que no son igualadas por reacciones en modelos de membrana.

De todos estos fenómenos metabólicos de membrana, de activación de factores de coagulación y demás fenómenos de reconocimiento y fijación se señalan químicas, nosotros nos vamos a fijar en los siguientes:

- Interacción plaqueta-subendotelio: adhesión plaquetaria.
- Activación de zimógenos en la superficie de plaqueta activada.
- Interacción entre plaquetas activadas: agregación plaquetaria.

- Reacción de liberación: degranulación.
- Interacción agregado de plaqueta-fibrina: retracción del coágulo.

I.2.1. Interacción plaqueta-subendotelio: adhesión plaquetaria

La vitalidad, integridad y contigüedad del endotelio vascular que expone una densidad de carga neta negativa a la luz vascular, es fundamental para el mantenimiento de las propiedades no trombogénicas en una situación llena de factores procoagulantes tales como plaquetas hiperactivas, estímulos hormonales, bioquímicos y tóxicos.

Cuando esta vitalidad, integridad y contigüedad se pierden por lesión vascular, las plaquetas, normalmente con una carga superficial neta negativa y en su flujo desplazadas por los eritrocitos de mayor tamaño del centro de la luz vascular hacia las paredes, interaccionan con el subendotelio expuesto, donde entre otros motivos que veremos se encuentran con las estructuras cuaternarias de colágeno con cargas positivas netas. Las estructuras de colágeno más activas desde el punto de vista de adhesión plaquetaria, se vió in vitro que eran las de colágeno I y colágeno III (2).

Además de estos factores electrostáticos y de estructura cuaternaria de colágeno, también se comprobó en cámara de perfusión con flujo en aorta invertida de conejo, el requerimiento de la presencia de factor von Willebrand, FVIII R:vW. La necesidad de este factor se sospechó por que en la enfermedad de von Wille

brand, que es una disfunción doble plaquetaria y procoagulante, se observa una adhesión plaquetaria a subendotelio defectuosa y una agregación plaquetaria inducida por ristocetina pobre, junto con una baja actividad coagulante y antigénica de FVIII (2).

Igualmente se observó en el síndrome de Bernard Soulier una adherencia a subendotelio defectuosa, una falta de agregación inducida por FVIII o por ristocetina, una fijación de trombina y una agregación inducida por ella deficiente, y una deficiencia en glicocalicina y glicoproteína Ib de banda I de glicoproteínas de membrana. Esto junto con otros hechos hizo postular que estas glicoproteínas están implicadas en la adhesión a subendotelio en un modo todavía no definido (3).

Por último la existencia de actividad glicosil transferásica en la membrana de plaqueta con especificidad para grupos galactosil hidroxilisina de colágeno, hizo postular que este complejo enzima-sustrato podía ser el responsable de la adhesión a subendotelio e incluso de la interacción célula-célula, en una extensión de la proposición de Roseman para adhesión entre células (4, 5).

De este modo tenemos ya varios factores relacionados, aunque no de modo totalmente preciso, con el mecanismo de adhesión de plaqueta a subendotelio:

- a.- Un factor electrostático, cargas netas negativas en la superficie de la plaqueta, frente a cargas netas positivas en el coágulo subendotelial.
- b.- El requerimiento de FVIIIIR:vW, normalmente ligado tanto a pared de endotelio como a pared de plaqueta.

c.- El papel de las glicoproteínas de banda I de membrana de plaqueta, la glicocalicina y la GP Ib.

d.- Y la hipótesis sin confirmar del complejo enzima:sustrato relacionado con la actividad glicosil transferásica de membrana de plaqueta.

Esta adhesión de plaquetas a colágeno induce una activación de los trombocitos con un cambio de su forma en disco hacia una esfera, así como la emisión de pseudópodos relacionados con el sistema de contracción celular, una secreción del contenido de gránulos de estas plaquetas adheridas al medio extracelular y por último, la exposición de FP3 que va a favorecer la puesta en marcha de las vías extrínseca e intrínseca de activación de coagulación.

#### I.2.2. Activación de zimógenos del sistema de coagulación en la superficie de plaqueta activada

La actividad procoagulante conocida como FP3 no está bien definida en qué consiste, pero se relaciona con los fosfolípidos de superficie de plaqueta, cuyas cabezas polares deben proporcionar una carga negativa neta óptima, uniformemente distribuida sobre la superficie (sea de plaqueta, sea de modelo de membrana fosfolipídica), y cuyas cadenas hidrofóbicas deben de estar suficientemente desaturadas como para gozar de las características de un cristal líquido a temperaturas fisiológicas (6).

Se cree que su papel es el de actuar de matriz sobre la que se van a efectuar mucho más eficientemente que en solución

la formación de los complejos de activación de zimógenos de coagulación. Esta actividad PF3 no está normalmente disponible en plaquetas intactas en reposo (no activadas); sin embargo, en un momento crítico durante su activación se expone esta actividad por un mecanismo todavía no bien dilucidado y que podría ser cualquiera de los que a continuación se relacionan (6):

- a.- Proteolisis: si PF3 se tratase de la superficie lipídica de membrana plasmática cubierta por una proteína de membrana.
- b.- Exocitosis: si PF3 residiese en membranas de gránulos expuestos durante la reacción de liberación.
- c.- Reorientación de lípidos procoagulantes por reordenación de la membrana durante la agregación: emisión de pseudópodos.
- d.- Lisis de plaquetas: si la actividad PF3 estuviese expuesta en el interior plaquetario.
- e.- Por último, mediante un mecanismo flip-flop del lado interno al lado externo de la membrana (catalizado por un enzima activado por una señal química procedente de la liberación de gránulos).

No hay pruebas efectivas de localización de PF3 en un lado u otro de la membrana, y por otro lado los estudios de distribución de las distintas especies de fosfolípidos entre los dos lados de la membrana no son definitivos pues hay cierta contradicción entre ellos.

Visto lo que esquemáticamente se sabe sobre PF3 y su muy probable identidad con la membrana de plaqueta activada, vamos a

ver brevemente su papel en la activación de zimógenos de coagulación. Un gran número de experimentos sugieren que la activación del sistema intrínseco de coagulación sucede en la superficie de plaqueta mediante interacciones altamente específicas para cada factor de coagulación (6, 7).

#### Formación de trombina

La generación de trombina a partir de protrombina se probó con factor Xa purificado que sucede en la superficie de la plaqueta catalizada por el complejo protrombinasa. Se encontró la existencia de alrededor de 200 receptores específicos para FXa por plaqueta, que aparecen después de la reacción de liberación y donde posiblemente interviene el FV liberado, y también se vió que estos receptores posiblemente son de naturaleza proteica por su susceptibilidad a trombina a alta concentración. Esta fijación de FXa a plaqueta hace a este factor unas  $3 \times 10^5$  veces más activo que en solución y unas  $10^3$  veces más activo que en micelas de fosfolípidos y FV. La protrombina se liga al complejo formado por FV, FXa, plaqueta activada (FP3) y  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante puentes de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus residuos  $\gamma$ -carboxiglutámicos del segmento N-terminal a los fosfolípidos, mientras que FV posiblemente se liga hidrofóbicamente a la membrana. Este complejo protrombinasa soportado y organizado sobre la membrana consigue tan eficientemente la aproximación e interacción de enzima y sustrato que hace esta reacción enormemente eficaz como se requiere.

### Formación de FXa

La formación de FXa como vimos anteriormente, se genera por dos caminos. Por la vía extrínseca mediante el complejo activador extrínseco de FX, que comprende FP3, FVIIIa,  $Ca^{2+}$  y FIII, y por la vía intrínseca mediante el complejo activador intrínseco de FX que comprende FIXa, FVIIIa,  $Ca^{2+}$  y FP3. Hay bastantes hechos, si bien no pruebas definitivas, que indican que FXa se genera en la superficie de plaqueta igual como anteriormente vimos para trombina. Se piensa de FVIIIa y FIII se ligan hidrofólicamente a la membrana mientras que FIXa y FVIIIa se ligan a receptores específicos, mientras que FX se liga en ambos complejos mediante puentes de  $Ca^{2+}$  desde sus residuos  $\gamma$ -carboxiglutámicos a fosfolípidos. Una vez FX se activa, FXa tiene dos caminos para dejar el complejo de activación y alcanzar su receptor específico y formar el complejo protrombinasa visto anteriormente; o bien sale al medio soluble o bien una vez ligado a su receptor migra por difusión lateral en la membrana hasta encontrarse con FV.

También se ha sugerido que FXII, FXI y FIX son activados y fijados en superficie de plaqueta activada de un modo similar a como vimos anteriormente para trombina y FXa.

### I.2.3. Interacción entre plaquetas activadas.

#### Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria es la consecuencia de la activación de plaquetas por una serie variada de señales químicas.

a.- Adhesión a colágeno.

- b.- ADP: procedente de la reacción de liberación de las propias plaquetas, o de eritrocitos u otras células dañadas.
- c.- Trombina: procedente de la activación de protrombina en la superficie de plaqueta adherida o agregada.
- d.- Tromboxano  $A_2$ : procedente de la activación de fosfolipasas de plaqueta, y subsiguiente liberación de ácido araquidónico, formación de endoperóxidos catalizada por la PG-ciclooxigenasa y por último formación de tromboxano  $A_2$  catalizada por la tromboxano sintetasa plaquetaria.
- e.- Ionóforos de  $Ca^{2+}$ : posiblemente vía activación de fosfolipasas.
- f.- Adrenalina.

Fisiológicamente el fenómeno de agregación presenta dos fases (2):

- 1<sup>a</sup> fase de agregación: es reversible, lleva consigo cambios en la forma de la plaqueta, emisión de pseudópodos y concentración de gránulos en el centro, y ocurre en presencia de EDTA, en trombostenia, y espontáneamente al bajar el pH por debajo de 6,3.
- 2<sup>a</sup> fase de agregación: es irreversible, y va acompañada de la reacción de liberación por degranulación. Requiere la presencia de  $Ca^{2+}$ , fibrinógeno, un pH entre 6,3 y 8,2, ATP metabólico. Se cree que hay una pérdida del glicocalix pero no está demostrado.

En cuanto a los inhibidores de agregación, actúan por mediación de c-AMP y son de dos tipos:

- a.- Los estimuladores de adenilato ciclasa: ATP, adenosina,

PGE<sub>1</sub>.

b.- Los inhibidores de fosfodiesterasa: papaverina, teofilina, dipiridamol.

Se cree que varios de los inductores de agregación actúan a través de ADP (colágeno, trombina, adrenalina), sin embargo no está definitivamente identificado el receptor en la superficie plaquetaria de este inductor (8), ni la cadena de acontecimientos que van desde el reconocimiento y fijación del ADP a la membrana de plaqueta hasta la puesta en marcha de la función fisiológica: la agregación.

Fisiopatológicamente en la trombastenia de Glanzmann, que cursa con un tiempo de hemorragia prolongado, carencia de agregación de plaquetas, retracción defectuosa del coágulo, cambio de forma normal inducida por ADP y deficiencia en GP IIb y GP IIIa de membrana de plaqueta, se relaciona esta carencia o deficiencia molecular con la carencia de agregación, por lo que se postula que si bien estas glicoproteínas no son el receptor de ADP, pues éste parece que está presente, si que intervienen en la cadena de acontecimientos que van desde la interacción del ADP con el receptor hasta la puesta en marcha de la agregación (3).

#### I.2.4. Reacción de liberación: degranulación

Dentro del citoplasma de plaquetas se observan dos tipos de gránulos (2):

a.- Los gránulos densos (unos 10 por plaqueta); contienen ADP, ATP, serotonina, pirofosfatos, Ca<sup>2+</sup>, etc.

b.- Los gránulos  $\alpha$  (unos 80 por plaqueta); con enzimas lisosomales, proteínas catiónicas, elastasa, factor quimotáctico, factor mitogénico,  $\beta$ -tromboglobulina, fibrinógeno, FP4 o neutralizante de heparina.

Durante la segunda etapa de agregación sucede la reacción de liberación, que dependiendo del agente inductor se distingue entre:

a.- Reacción de liberación tipo I o de gránulos densos; estimulada por ADP, adrenalina, serotonina. Es una secreción rápida.

b.- Reacción de liberación tipo II o de gránulos  $\alpha$  y gránulos densos; se distingue de la anterior por la liberación de enzimas lisosomales que se emplean como marcadores y los agentes estimulantes de esta reacción son trombina y colágeno.

Estas reacciones de liberaciones se efectúan por exocitosis mediante fusión de las membranas de gránulos con la membrana plasmática del sistema canalicular ligado a la superficie (6), con participación de los elementos contráctiles y donde el calcio tiene un papel iniciador, pudiendo su liberación al interior citoplásmico realizarse mediante ionóforos de  $Ca^{2+}$  desde el exterior o bien mediante liberación de calcio de los túbulos densos del interior plaquetario, que actúan como depósito de  $Ca^{2+}$  al igual que el retículo sarcoplásmico y el sistema T de músculo.

En cuanto a los inhibidores tenemos la aspirina que inhibe la GP-ciclooxygenasa, la citocalasina B que desorganiza el sistema contráctil, la vincristina que inhibe microtúbulos y

PGE<sub>1</sub> y PGD<sub>2</sub> que aumentan el c-AMP.

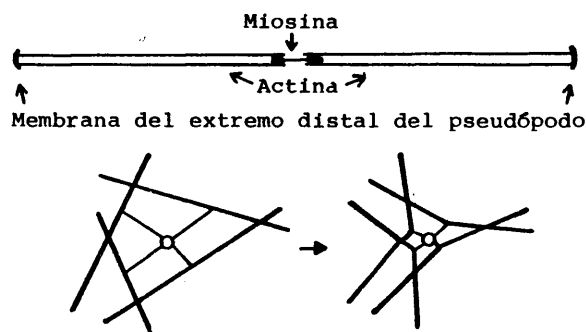
Fisiopatológicamente tenemos la enfermedad de reservas de almacenamiento (storage pool disease) que cursa con carencia de almacenamiento de ADP, ATP, 5HT y Ca<sup>2+</sup>, tiempo de hemorragia prolongado, agregación disminuida con colágeno y trombina, ausencia de segunda onda de agregación con adrenalina, y agregación reversible con ADP.

#### I.2.5. Interacción agregado de plaquetas-fibrina; retracción del coágulo y sistema de contracción

Con la información actualmente disponible se postuló (9) un mecanismo de contracción de pseudópodos de plaqueta activada que requiere: que estos pseudópodos deben de penetrar un volumen igual al de suero desplazado; que deben de ligarse a hebras de fibrina o a la superficie de otras plaquetas, y que el sistema de contracción mecanoquímico debe de estar dispuesto de tal modo que tire de los pseudópodos hacia el cuerpo de la plaqueta.

Se puede calcular que hay suficiente actina en plaqueta para formar la cantidad de pseudópodos requerida para poder penetrar el volumen equivalente al de suero desplazado. En cuanto a la interacción de pseudópodos de plaqueta activada entre sí y con fibrina, hay evidencias morfológicas y fisiológicas de que tiene lugar, y posiblemente durante la formación del coágulo aun que se carece actualmente de una caracterización química de esta interacción. Por último, con respecto a la disposición de actina y miosina en plaquetas activadas, parece que los filamentos de

actina están dispuestos en haces, todos ellos con la misma polaridad, llenando los pseudópodos, y orientados de tal modo que el extremo distal del pseudópodo sería el equivalente de la línea Z en músculo, mientras que la miosina está mayoritariamente en el cuerpo central de plaqueta activada formando filamentos bipolares. De este modo, estos filamentos bipolares de miosina podrían entrelazar filamentos antiparalelos de actina, procedentes de pseudópodos situados opuestamente y dirigidos hacia el centro plaquetario, formando un sistema contráctil geoméricamente parecido a una sarcomera muscular, tal como se esquematiza a continuación, según (9):



La interacción de los filamentos de actina con la miosina y ATP en el medio de la plaqueta desarrollaría una fuerza tractora sobre los filamentos de actina y secundariamente sobre los pseudópodos y las hebras de fibrina del coágulo ligadas a ellos, hacia el centro de la plaqueta, con la consiguiente retracción del coágulo (9).

Este mecanismo de contracción del coágulo incluye toda la evidencia experimental disponible actualmente, pero tiene por delante una amplia etapa experimental de verificación.

### I.3. MEMBRANA PLASMÁTICA DE PLAQUETAS HUMANAS. GLICOPROTEINAS

#### I.3.1. Origen de la membrana plasmática de plaquetas humanas

Esta membrana deriva de las membranas del sistema de demarcación citoplásmico del megacariocito (11), sistema que muy posiblemente se deriva de la membrana plasmática de éste por invaginación (12, 13, 14), aunque también se han sugerido otros orígenes (15).

La fusión de las membranas tubulares del sistema de demarcación entre sí, daría lugar a membranas planas quedando el citoplasma y sus orgánulos subcelulares distribuidos y rodeados por éstas, dando así origen a alrededor de 2.000 plaquetas por megacariocito (16).

La membrana plasmática de plaquetas así formada, de 7 a 9 nm de espesor, presenta profundas invaginaciones hacia el interior, formando el sistema canalicular conectado a superficie, sistema que aproxima muy eficazmente el interior al exterior celular y juega un importante papel en la fisiología plaquetaria como vimos anteriormente.

Mediante estudios citoquímicos, Benhke (17) y Hovig (18), observaron la presencia de un halo que rodea la membrana plasmática, de 10-20 nm y rico en carbohidratos, al que se denominó glicocalix. Este glicocalix se puede digerir proteolíticamente sin grandes cambios en la ultraestructura de la membrana (18), con la que no se conoce bien su grado de relación estructural. Funcionalmente no es mucho tampoco lo que se conoce sobre el glicocalix y nos ocuparemos más adelante, al tratar de una proteína

que se cree procede de él, la glicocalicina.

### I.3.2. Antecedentes

La MPPH tiene un 36% de proteínas, 52% de lípidos y un 7% de azúcares, de los cuales 63% son hexosas, 29% hexosaminas y un 8% ácido siálico (19).

Estudios citoquímicos, de aglutinación con virus y de unión con diferentes lectinas, fueron las primeras evidencias de la existencia de azúcares en la superficie plaquetaria. Así se vió que las plaquetas se aglutinan en presencia de WGA y RCA , mientras que no lo hacen con Con A, PSA ni con LCA, si bien estas últimas sí originan la liberación de serotonina (20).

Al principio de la década de los setenta se hicieron estudios de digestión de plaquetas completas con diferentes proteasas (21, 22, 23) principalmente tripsina, encontrándose en todos los casos tres glicopéptidos de 120.000 (Gp I), 22.500 (Gp II) y 5.000 (Gp III). El Gp I se aisló mediante digestión tanto de plaquetas completas (23) como de membranas aisladas (22) y se caracterizó (21). Tiene un 70% de azúcares, y es capaz de inhibir la aglutinación de plaquetas por WGA (20).

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, se muestra que la MPPH contiene proteínas cuyos pesos moleculares aparentes oscilan entre 250.000 y 13.000 y tres bandas principales de glicoproteínas denominadas GP I (155.000-150.000) , GP II (135.000-120.000) y GP III (103.000-95.000) (24, 25, 26, 27).

En la fracción soluble del lisado de plaquetas se obser-

vó que había una glicoproteína, cuya movilidad electroforética era similar a la GP I, a la que se denominó glicocalicina (GC) por su posible origen en el glicocalix plaquetario. Esta glicoproteína tiene 62% de azúcar, destacando su alto contenido en galactosa y NANA (28).

La fracción GP I contiene la mayor parte del ácido siálico de la plaqueta, es la más susceptible a la digestión cuando se tratan plaquetas completas con tripsina (29) y es la que menos se ioda con  $^{125}\text{I}$  mediante catálisis con lactoperoxidasa (25, 30), siendo la fracción GP III la que más se marca. Esta GP III fué parcialmente purificada (25) y se preparó un anticuerpo frente a ella que era capaz de aglutinar plaquetas.

También durante esta etapa se trató de identificar los receptores para trombina, activador plaquetario natural como vimos anteriormente. Phillips y P. Agin (30), encuentran que la fracción GP II es susceptible a la trombina, observando un descenso en su concentración al tratar plaquetas completas con esta enzima.

En 1975 Phillips et al (31), observan en plaquetas marcadas con  $^{125}\text{I}$ , que GP II incluye dos componentes, GP IIa y GP IIb, GP IIa migrando entre GP I y GP IIb y GP IIb en la misma posición que la GP II original. Esta es la primera evidencia de que el patrón de glicoproteínas era más complejo que el originalmente observado.

También hacia el final de esta etapa se encuentran las primeras manifestaciones de patología molecular de glicoproteínas de MPPH. En 1974 Nurden y Caen (24) describen una disminu-

ción de GP II en plaquetas de enfermos con trombostenia de Glanzmann, y al año siguiente estos mismos investigadores (29) encuentran la casi desaparición de GP I en plaquetas del síndrome de Bernard Soulier, lo que estaba de acuerdo con la drástica reducción en el contenido de ácido siálico que se había observado anteriormente en estas plaquetas gigantes (32).

Phillips et al (31) también observan una reducción de la incorporación de iodo radiactivo en las fracciones GP IIb y GP III.

Por último, la disponibilidad de un antisuero desarrollado en un enfermo trombosténico politransfundido con plaquetas normales (33) permitió comprobar la existencia de anticuerpos frente a una glicoproteína de membrana de un peso molecular aparente de 120.000.

#### I.3.2.1. Estructura de glicoproteínas

En 1976, George et al (34) marcando plaquetas intactas con  $DD^{125}ISA$ , encuentran mediante electroforesis que son las fracciones GP II y GP III las que se marcan, y además que en la fracción GP II hay dos componentes, como ya se había observado (31), siendo el de menor movilidad, denominado GP IIa (125.000), el que predomina en muestras sin reducir, y el de mayor movilidad, denominado GP II (118.000) el que predomina en muestras reducidas. Sugieren así estos autores que se trata de la misma proteína en diferente estado de reducción señalando la existencia

de enlaces disulfuro en estas glicoproteínas.

Sorprende en estos estudios el que la fracción GP I tan accesible a la hidrólisis con tripsina (26) apenas se marque con las técnicas de iodación. Una explicación sería el que la parte glicosilada de esta fracción con alto contenido en ácido silícico, impidiese el acceso de los marcadores a los residuos de tirosina.

También este año Okumura y Jamieson (35) observan en muestras reducidas con mercaptoetanol una nueva fracción de glicoproteína en los perfiles electroforéticos que ellos llaman GP IV (87.000).

Al año siguiente, Phillips y P. Agin (36), utilizando electroforesis bidimensional, encuentran seis componentes que se tiñen para glicoproteínas y se marcan mediante la técnica de lactoperoxidasa, y que denominan GP Ia, GP Ib, GP IIa, GP IIb, GP III y GP IV. Todos excepto GP IV varían su movilidad con la reducción, unos aumentándola (GP Ib y GP IIb) y otros disminuyéndola (GP Ia, GP IIa y GP III), confirmando la existencia de enlaces disulfuro en estas glicoproteínas y la existencia de estados intermedios de reducción.

Clemetson et al (37) basándose en la distinta afinidad de estas glicoproteínas de MPPH para diferentes lectinas (WGA, LCA y APA), encuentran que la fracción GP I consta de dos especies, la GP Ia y la GP Ib en orden creciente de movilidad, migrando la GP Ia junto con la GP Ib en estado reducido. Estos autores relacionan la GP Ib con GC, por tener ambas afinidad por WGA. En cuanto a GP IIa y GP IIb también sugieren que es

la misma glicoproteína en diferente estado de reducción. En la fracción GP III encuentran dos componentes, GP IIIa que se tiñe intensamente tanto para azúcares como para proteína, que desciende de su movilidad con la reducción y que tiene afinidad por LCA, y GP IIIb que apenas se tiñe para proteínas y sí se tiñe para carbohidratos, no varía su movilidad con la reducción y tiene afinidad por APA.

Estas variaciones en los patrones electroforéticos de glicoproteínas de MPPH son debidos a las diferencias en el gel de poliacrilamida, concentración de agentes reductores y tampones utilizados por los distintos laboratorios (3).

Pasamos ahora a relacionar la información sobre disposición de glicoproteínas en MPPH que se generó en esta etapa mediante técnicas de marcado de superficie celular y proteólisis.

Okumura y Jamieson (35, 38), observaron que en células completas la tripsina destruye en 1 min GC y GP I y el 50% de GP III, permaneciendo intactas después de 60 min el 30% de GP II y toda la GP IV, lo que sugiere que la fracción GP II son al menos dos componentes distintos. En membranas aisladas se digieren todas las glicoproteínas por tripsina, incluida la GP IV. La iodación por lactoperoxidasa marca sobre todo la fracción GP III mientras que el marcado mediante transglutaminasa aparece sobre todo en GP III y GC.

De estos resultados se podría deducir que las glicoproteínas GP I, GP II y GP III, deben de ser componentes integrales de la membrana con una porción accesible en la superficie externa, mientras que GP IV debe de encontrarse en la membrana expo-

niéndose únicamente en la cara citoplásmica. Estas conclusiones están de acuerdo con los resultados de George et al (34), quienes observan que GP I, GP II y parte de GP III son digeridas por tripsina en células completas. Dado que el sistema electroforético utilizado por estos autores no les permite distinguir entre GP IIIa y GP IIIb, se puede interpretar que la porción de GP III que no se digiere sería aquella equivalente GP IIIb ó GP IV de Okumura y Jamieson (35).

Otro aspecto que interesó a varios laboratorios durante este periodo fué la dilucidación de las relaciones entre GC y GP I, postulándose que: o bien GC y GP I son iguales estructuralmente pero están ligadas a la membrana de modo diferente, lo que explicaría el que la primera se desprendiese de ella con más facilidad que la segunda durante la homogeneización; o bien que las fracciones macroglicopeptídicas obtenidas por digestión de las dos fracciones son iguales, diferenciándose únicamente en el péptido pequeño, el cual estaría más débilmente unido a la membrana en el caso de la GC (35).

Por el contrario, Nachman et al (39) mediante la comparación de los mapas peptídicos de los componentes de un complejo aislado mediante cromatografía de afinidad con WGA, con los de GC aislada según (38), ponen en duda el que GC y GP I sean proteínas similares, inclinándose a que son completamente diferentes.

Finalizamos esta parte estructural de glicoproteínas de MPPH con la Tabla 1, en la que se establece la nomenclatura que se adoptará en lo sucesivo a lo largo de esta tesis para las di-

TABLA I

| NOMENCLATURA ANTIGUA                      | NOMENCLATURA ADOPTADA EN ESTE TRABAJO                   | CORRESPONDENCIA CON OTRAS NOMENCLATURAS  |
|---|---|--|
| Fosfatos<br>5% acrilamida                 | Tris-glicina<br>7% acrilamida                           | GC (35, 38, 51)<br>GPS (43)<br>GP Is (3, 41)   |
| GP I (R)<br>(24, 25, 26, 27,<br>29, 30)   | GC = glicocalicina                                      | GP Ia (SR)<br>GP Ib (SR)<br>GP I (R)<br>GP I (SR)                                      |
| GP II (R)<br>(24, 25, 26, 27,<br>29, 30)  | GP Ia (SR)<br>GP Ib (SR)<br>GP I (R)<br>GP I (SR)       | GP Ia (SR) (37)<br>GP Ib (SR) (37)<br>GP I (31, 35, 43, 44)<br>GP Ib (3)<br>GP Im (41) |
| GP III (R)<br>(24, 25, 26, 27,<br>29, 30) | GP IIa (SR)<br>GP IIb (R)<br>GP III (SR)                | GP IIa (31, 34, 36)<br>GP IIb (31, 37)<br>GP II (34, 35, 44)                           |
| GP III (R)<br>(24, 25, 26, 27,<br>29, 30) | GP III (SR)<br>GP IIIa (R)<br>GP III (R)<br>GP IIIb (R) | GP IIIa (3, 37)<br>GP III (35, 44)<br>GP IIIb (3, 37)<br>GP IV (35, 44)                |

(SR, muestras sin reducir. R, muestras reducidas).

ferentes fracciones de glicoproteínas y su correspondencia con la nomenclatura utilizada en la bibliografía.

#### I.3.2.2. Función de las glicoproteínas

Desde el punto de vista funcional, la fuente de sugerencias hasta el momento es la patología molecular de estas glicoproteínas.

Los estudios electroforéticos de varios laboratorios (40, 41, 42, 43), llegan a la conclusión de que tanto GP IIB como GP IIIa están disminuidas en plaquetas de pacientes con la enfermedad de Glanzmann. Jamieson et al (44) en un intento de cuantificación de este descenso observan un descenso de GP IIA del 75% y una disminución de GP III del 60%.

Faltaba encontrar una relación causal entre descenso de estas glicoproteínas y ausencia de aglutinación, para poder inequívocamente relacionar estas glicoproteínas con alguna etapa de la función de agregación.

La disponibilidad del antisuero procedente de un enfermo trombosténico politransfundido con plaquetas normales, permitió observar que a concentraciones subaglutinantes este antisuero inhibe la agregación de plaquetas normales y la retracción del coágulo, inducidos por agentes fisiológicos, no afectando sin embargo la agregación inducida por ristocetina, ni la aglutinación por F VIII, ni la adhesión a subendotelio (45), que hoy se sospecha están mediadas por GP I. Este comportamiento trombosténico impuesto sobre plaquetas por este antisuero permite relacionar las glicoproteínas ausentes en la membrana de plaquetas de enfer

medad de Glanzmann con alguna etapa de la agregación, aunque no con la primera, ya que el antisuero no inhibe la fijación de ADP a plaquetas normales (45), ni la fijación de ADP y ni la de trombina están alteradas en plaquetas trombosténicas.

Además, como en estas plaquetas patológicas si que sucede la primera etapa de agregación, esto es, los cambios de forma (46), todo parece indicar que el defecto está en la formación de uniones plaqueta-plaqueta.

Ya habíamos visto que el síndrome de Bernard Soulier está relacionado con un defecto de glicoproteínas de la fracción GP I (29). Nurden y Caen (47) no encuentran liberación de GC en la fracción soluble de lisis de plaquetas de enfermos con este síndrome ni tampoco al incubarlas con ClK 3M (3), encontrando mediante electroforesis que GC está ausente y que GP I está disminuida o ausente (41). A los mismos resultados llegan Solum (48) y Hagen (43). Jamieson et al (44) en un intento de cuantificación muestran una falta total de GC y una disminución del 50% de GP Ib. Vemos pues que todos los laboratorios encuentran una ausencia de GC y un defecto muy pronunciado o total de GP Ib.

También en este caso la disponibilidad de un antisuero procedente de un enfermo de Bernard Soulier politransfundido con plaquetas normales, permitió establecer una relación más estrecha entre las glicoproteínas ausentes y el defecto de adhesión a subendotelio (49). Este antisuero a concentraciones subaglutinantes inhibe en plaquetas normales la adhesión a subendotelio, la agregación inducida por ristocetina y la aglutinación por F VIII, al igual que sucede en plaquetas de Bernard Soulier, no

afectando a la agregación inducida por ADP o colágeno.

Todo esto sugiere una relación causal de la falta de estas glicoproteínas con los defectos de adhesión a subendotelio y agregación por ristocetina y F VIII, y por tanto el papel de estas proteínas en estos fenómenos.

Otras observaciones apoyan esta hipótesis. Así, el almacenamiento de plaquetas durante 7 a 9 días en tampón Tris-ClNa a 4°C, la congelación y descongelación de plaquetas, etc, todos ellos fenómenos que liberan GC, van acompañados de pérdida de capacidad de agregación por F VIII (50, 48). Igualmente la adición de GC purificada a plaquetas, inhibe competitivamente la agregación por ristocetina (51).

La unión de trombina a plaquetas de Bernard Soulier es defectuosa, como también lo es la agregación que se observa a continuación (52), lo que sugiere que GP Ib y/o GC pueden estar relacionadas con la interacción trombina-MPPH.

En 1978 Okumura et al (53) observan que la mitad de GP I puede solubilizarse de la membrana mediante ClNa 1M, y que esta fracción solubilizada es un inhibidor competitivo, al igual que GC, de la unión de trombina a plaquetas intactas, atribuyéndole a estas dos fracciones el papel de receptores de trombina, residiendo esta actividad no en el macroglicopéptido sino en el péptido tríptico de 45.000 dalton.

Este papel receptor también se atribuyó a una fracción de 150.000 de peso molecular aparente, aislada mediante electroforesis preparativa (54) y a otra fracción de GP I aislada mediante cromatografía de afinidad con WGA (55), en ambos casos

por inhibir la coagulación de fibrinógeno por trombina.

Además de lo ya expuesto, también se han encontrado defectos de las glicoproteínas en otras trombopatías congénitas (56, 44) y en algunos casos de trombopatías adquiridas (57, 58, 59), que no vamos a comentar por no estar su estudio suficientemente desarrollado como para que sea ilustrativo desde el punto de vista funcional.

I.3.3. Interés de la membrana plasmática de plaquetas humanas como material de estudio. Trascendencia de su conocimiento en coagulación y hemostasia y en su patología

A lo largo de este capítulo hemos visto la riqueza funcional de las plaquetas y el papel que su superficie externa juega en fenómenos tan variados como adhesión a subendotelio, agregación plaquetaria, activación de zimógenos de coagulación, liberación del contenido de gránulos y retracción del coágulo. Esta diversidad de fenómenos relacionados con estas membranas las hacen muy atractivas como objetos de estudio, sin embargo no podemos olvidar que esta diversidad funcional está basada en una complejidad estructural que hace a la vez que estas membranas sean objetos difíciles de estudio con las técnicas actualmente disponibles.

El papel primordial que la membrana plasmática de plaqueta tiene en la actividad plaquetaria, la capacidad de reconocer específicamente señales químicas y de iniciar la cadena de acontecimientos que llevan al efecto fisiológico de estas señales, ha-

ce que el estudio de su estructura y la dilucidación de la función de sus componentes moleculares sea un área de especial relevancia en la investigación básica sobre coagulación y hemostasia, así como en la investigación clínica sobre trombocitopatías de membrana y trombosis.

#### I.4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Como hemos visto a lo largo de la introducción, la disposición de átomos y moléculas desarrollada por la naturaleza en estructuras supramoleculares altamente organizadas, permite modos de reacción de extraordinaria especificidad y eficacia. Así, la membrana plasmática de plaqueta la hemos visto secuencialmente relacionada con fenómenos de adhesión a subendotelio, con agregación plaqueta-plaqueta, con liberación del contenido de gránulos, con activación de zimógenos del sistema de coagulación, con la retracción del tapón hemostático, etc, fenómenos todos ellos desencadenados por efectores específicos sobre la membrana y que tienen por base la dinámica molecular de la membrana en cuestión.

Recordando a Witt (10), cada problema en bioquímica física, esto es, el conocimiento de la dinámica molecular de un sistema biológico cualquiera, tiene que ser atacado desde cuatro ángulos distintos:

- a.- Los fenómenos macroscópicos. Son los fenómenos observables a nivel macroscópico resultado de numerosos ciclos funcionales de la todavía desconocida maquinaria molecular del sistema.

- b.- La organización estructural. El conocimiento sobre la naturaleza química de los distintos componentes que forman la estructura del sistema en cuestión, así como su localización en el espacio y en función del tiempo, es una etapa ineludible para llegar al conocimiento de la dinámica molecular de un sistema funcional.
- c.- Hipótesis. Es la etapa en el desarrollo del conocimiento científico que permite ordenar, correlacionar e interpretar los datos experimentales existentes sobre el objeto de estudio y preparar el plan de acción para el futuro . Por su naturaleza provisional, las hipótesis generan la búsqueda de evidencias ulteriores.
- d.- Fenómenos moleculares. La medida directa de acontecimientos moleculares es la fuente de información más inmediata sobre la dinámica molecular base de una función biológica. Sin embargo, este estudio directo de acontecimientos moleculares en componentes individuales de la estructura nativa, esto es, que guarda las características funcionales del sistema biológico original, con frecuencia es o muy difícil o incluso imposible, dadas las limitaciones inherentes a muchas de las técnicas actualmente disponibles. Esto es lo que hace que los modelos, esto es, sistemas químico-físicamente más sencillos y mejor definidos, sean de especial interés para la caracterización funcional, como ya vimos anteriormente.

Aquí, una vez más, la tesis general es que la dinámica

molecular de la membrana plasmática de plaqueta y sus distintos componentes moleculares, en nuestro caso particular la glicoproteína IIIa, y por tanto las distintas funciones anteriormente relacionadas, se basan en sus características estructurales y en las consecuencias que perturbaciones químicas o físicas, particularmente los distintos efectores específicos de MPPH, tienen sobre estas propiedades estructurales.

Vistos los antecedentes del tema y los posibles niveles de estudio, pasamos a esquematizar nuestros objetivos y plan de trabajo.

#### I.4.1. Objetivos

En el año 1976, fecha de comienzo de este trabajo, los fenómenos macroscópicos de la fisiología plaquetaria ya estaban bastante bien caracterizados. Estructuralmente sólo se había purificado una glicoproteína de membrana plasmática, la proteína extrínseca glicocalicina, y funcionalmente se había postulado una relación entre los fenómenos de fisiología plaquetaria con determinados componentes de membrana. En cuanto a fenómenos moleculares, prácticamente no había nada dilucidado.

Pensamos entonces concentrarnos en un componente mayoritario de membrana, aislarlo, caracterizarlo estructuralmente y penetrar en su dinámica molecular para lo cual el laboratorio se estaba preparando, fundamentalmente mediante técnicas de espectroscopía de absorción y emisión en el ultravioleta y visible.

Dificultades de distinto tipo, fundamentalmente la de encontrar una fuente que proporcionase un suministro regular y su-

ficiente de plaquetas durante los primeros dos años, hicieron que nuestros primeros objetivos se viesan recortados a solamente aislamiento y caracterización parcial de la GP IIIa, glicoproteína mayoritaria de MPPH.

Objetivos:

- a.- Incorporación de la técnica de preparación de membrana plasmática de plaqueta humana.
- b.- Caracterización de MPPH.
- c.- Desarrollo de técnicas de solubilización y solubilización selectiva de proteínas de MPPH.
- d.- Aislamiento de GP IIIa.
- e.- Caracterización química y quimicofísica de GP IIIa.

Para alcanzar estos objetivos nos hicimos el siguiente plan de trabajo:

I.4.2. Plan de trabajo

- a.- Establecimiento de una fuente que proporcionase suministro regular y suficiente de concentrados de plaquetas humanas.
- b.- Selección e incorporación de una técnica de preparación de MPPH, teniendo en cuenta el grado de pureza, el rendimiento de membrana y la sencillez de la técnica.
- c.- Exploración de procedimientos físicos y químicos para la solubilización y solubilización selectiva de proteínas de MPPH.
- d.- Combinación de métodos cromatográficos y electroforéticos

para el aislamiento y determinación del grado de pureza de GP IIIa a partir de MPPH solubilizadas.

- e.- Determinación de la composición química de GP IIIa. Contenido en aminoácidos y azúcares.
- f.- Estudio del tamaño y la naturaleza monomérica o polimérica de la glicoproteína aislada.
- g.- Caracterización mediante espectroscopía de absorción y emisión en el UV. Determinación del coeficiente de extinción.

I.5. BIBLIOGRAFIA

- (1) TANFORD, C. (1973)  
en The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes. John Wiley , New York.
- (2) SIXMA, J.J. y WESTER, J. (1977)  
Seminars Hematol. 14, 265.
- (3) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1979)  
Seminars Hematol. 16, 234.
- (4) JAMIESON, G.A., FULLER, N.A., BARBER, A.J. y LOMBART, C. (1971)  
Ser. Haemat. 4, 125.
- (5) ROSEMAN, S. (1970)  
Chem. Phys. Lipid 5, 270.
- (6) ZWAAL, R.F.A. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta 515, 163.
- (7) MAJERUS, P.W. y MILETICH, J.P. (1979)  
Ann. Rev. Med. 29, 41.
- (8) ADLER, J.R. y HANDIN, R.I. (1979)  
J. Biol. Chem. 254, 3806.
- (9) POLLARD, T.D., FUJIWARA, K., HANDIN, R. y WEISS, G. (1977)  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 283, 218.
- (10) WITT, H.T. (1971)  
Quart. Rev. Biophys. 4, 365.

- (11) O'BRIEN, J.R. (1970)  
Ser. Haematol. 4, 68.
- (12) BEHNKE, O. (1969)  
J. Ultrastruct. Res. 26, 111.
- (13) BEHNKE, O. (1968)  
J. Ultrastruct. Res. 24, 412.
- (14) SHAKLAI, M. y TAVASSOLI, M. (1978)  
J. Ultrastruct. Res. 62, 270.
- (15) SCHULZ, H. (1966)  
Verh. Deut. Ges. Pathol. 50, 239.
- (16) HARKER, L.A. (1971)  
en "The Platelet" (Brinkhous, K.M., Shermer, R.W. y  
Mostofi, F.K., eds.) p. 13, Williams and Wilkins, Baltimore
- (17) BEHNKE, O. (1967)  
Anat. Record. 158, 121.
- (18) HOVIG, T. (1968)  
Ser. Haematol. 1, 3.
- (19) BARBER, A.J. y JAMIESON, G.A. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 6357.
- (20) GREENBERG, J.H. y JAMIESON, G.A. (1974)  
Biochim. Biophys. Acta 345, 231.
- (21) PEPPER, D.S. y JAMIESON, G.A. (1970)  
Biochemistry 9, 3706.
- (22) BARBER, A.J. y JAMIESON, G.A. (1971)  
Biochemistry 10, 4711.
- (23) JAMIESON, G.A., FULLER, N.A., BARBER, A.J. y LOMBART, C. (1971)  
Ser. Haematol. 4, 125.

- (24) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1974)  
Brit. J. Haematol. 28, 253.
- (25) NACHMAN, R.L., HUBBARD, A. y FERRIS, B. (1973)  
J. Biol. Chem. 248, 2928.
- (26) PHILLIPS, D.R. (1972)  
Biochemistry 11, 4582.
- (27) NACHMAN, R.L. y FERRIS, B. (1972)  
J. Biol. Chem. 247, 4468.
- (28) LOMBART, C., OKUMURA, T. y JAMIESON, G.A. (1974)  
FEBS Lett. 41, 30.
- (29) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1975)  
Nature 255, 720.
- (30) PHILLIPS, D.R. y POH AGIN, P. (1974)  
Biochim. Biophys. Acta 352, 218.
- (31) PHILLIPS, D.R., JENKINS, C.S.P., LUSCHER, E.F. y  
LARRIEV, M.J. (1975)  
Nature 257, 599.
- (32) GROTTUM, K.A. y SOLUM, N.O. (1969)  
Brit. J. Haematol. 16, 275.
- (33) DEGOS, L., DAUGTIGNY, A., BROVET, J.C., COLOMBANI, M.,  
ARDAILLOU, N., CAEN, J.P. y COLOMBANI, J. (1975)  
J. Clin. Invest. 56, 236.
- (34) GEORGE, J.N., POTTERF, R.D., LEWIS, P.C. y SEARS, D.A. (1976)  
J. Lab. Clin. Med. 88, 232.
- (35) OKUMURA, T. y JAMIESON, G.A. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 5944.

- (36) PHILLIPS, D.R. y POH AGIN, P. (1977)  
J. Biol. Chem. 252, 2121.
- (37) CLEMETSON, K.J., PFUELLER, S.L., LUSCHER, E.F. y  
JENKINS, C.H.S.P. (1977)  
Biochim. Biophys. Acta 464, 493.
- (38) OKUMURA, T., LOMBART, C.H. y JAMIESON, G.A. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 5950.
- (39) NACHMAN, R.L., KINOSHITA, T. y FERRIS, B. (1979)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2952.
- (40) PHILLIPS, D.R. y POH AGIN, P. (1977)  
J. Clin. Invest. 60, 535.
- (41) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1977)  
Thrombos. Haemostas. 38, 200.
- (42) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1978)  
Brit. J. Haematol. 38, 155.
- (43) HAGEN, I. y SOLUM, N.O. (1978)  
Thromb. Res. 13, 845.
- (44) JAMIESON, G.A., OKUMURA, T., FISHBACK, B., JOHNSON, M.M.,  
EGAN, J.J. y WEISS, H.J. (1979)  
J. Lab. Clin. Med. 93, 652.
- (45) LEVY-TOLEDANO, S., TOBELEM, G. y LEGRAND, C. (1978)  
Blood 51, 1065.
- (46) CAEN, J.P. y MICHEL, H. (1972)  
Nature 240, 148.
- (47) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1976)  
Thrombos. Haemostas. 35, 139.

- (48) SOLUM, N.O., HAGEN, I. y GJEMDAL, I. (1977)  
Thrombos. Haemostas. 38, 914.
- (49) TOBELEM, G., LEVY-TOLEDANO, S., BREDOUX, R., MICHEL, H.,  
NURDEN, A. y CAEN, J.P. (1976)  
Nature 263, 427.
- (50) GEORGE, J.N. (1976)  
Thromb. Res. 8, 719.
- (51) OKUMURA, T. y JAMIESON, G.A. (1976)  
Thromb. Res. 8, 701.
- (52) JAMIESON, G.A. y OKUMURA, T. (1978)  
J. Clin. Invest. 61, 861.
- (53) OKUMURA, T., HASITZ, M. y JAMIESON, G.A. (1978)  
J. Biol. Chem. 253, 3435.
- (54) GANGULY, P. y GOULD, N.L. (1979)  
Brit. J. Haematol. 42, 137.
- (55) NACHMAN, R.L., TARASOV, E., WEKSLER, B.B. y  
FERRIS, B. (1977)  
Thromb. Res. 12, 91.
- (56) BOLIN, R.B., OKUMURA, T. y JAMIESON, G.A. (1977)  
Nature 269, 69.
- (57) VAINER, H. y BUSSEL, A. (1976)  
Nouv. Rev. Franc. D'Hematol. 16, 447.
- (58) VAINER, H. y BUSSEL, A. (1977)  
Int. J. Cancer 19, 143.
- (59) ORDINAS, A., MARAGALL, S., CASTILLO, R. y  
NURDEN, A.T. (1978)  
Thromb. Res. 13, 297.

CAPITULO II.- MATERIALES Y METODOS

#### II.1. FUENTE Y PREPARACION DE PLAQUETAS

En este trabajo se han utilizado concentrados de plaquetas procedentes de sangre de donantes voluntarios; cada unidad de plaquetas procede de aproximadamente 450 ml de sangre y consta de una porción de plasma muy rico en plaquetas, casi exenta de eritrocitos.

Estos concentrados fueron facilitados por los Servicios de Hematología, primeramente de la Ciudad Sanitaria "La Paz" y con posterioridad del Centro Especial "Ramón y Cajal" de Madrid.

En las primeras etapas del trabajo se utilizaron plaquetas obtenidas dentro de las 6 primeras horas después de la extracción de sangre. Posteriormente, con el fin de disponer de mayor cantidad, se emplearon plaquetas procedentes de concentrados que habían estado de 3-7 días a temperatura ambiente con agitación suave.

La metodología seguida con estos concentrados para el aislamiento de las plaquetas ha sido básicamente la propuesta por Barber y Jamieson (1) y consiste primeramente en una centrifugación a 1500xg durante 1 min, para eliminar restos de eritrocitos y dependiendo del contenido en éstos, muy diferente de unos concentrados a otros, se repite 2 ó 3 veces.

Las plaquetas se separan del plasma, centrifugando éste

a 4.300xg durante 10 min. Los sedimentos de plaquetas se lavan 3 veces con tampón de lavado que contiene EDTA 0,001M, Tris-ClH 0,01M (pH 7,4), ClNa 0,15M. Una vez lavados, los sedimentos se resuspenden en una pequeña cantidad del tampón de lavado (aproximadamente 1 ml/U de plaquetas) y se siembran en gradientes continuos de glicerol del 0 al 40% (v:v) de 30 ml de volumen. En cada gradiente se siembran plaquetas procedentes de 3 ó 4 unidades. Estos gradientes se centrifugan en un rotor swing-out (MSE SW25) durante 30 min a 1.465xg y 10 min a 5.800xg a 4°C.

La centrifugación en estos gradientes se realiza para que las plaquetas se carguen con glicerol y se alcance una concentración intracelular de 4,3M.

Una vez concluida la centrifugación se elimina el sobrenadante con cuidado y el sedimento de plaquetas cargadas se mantiene congelado a -20°C hasta proceder al aislamiento de las membranas.

## II.2. METODO DE AISLAMIENTO DE MPPH

La primera etapa en el aislamiento de MPPH es la lisis de las plaquetas cargadas con glicerol. Esta se realiza suspendiendo los sedimentos cargados, previamente descongelados, en aproximadamente 4-5 veces su volumen en tampón Tris-ClH 0,01M (pH 7,5), sacarosa 0,25M (Tris-sacarosa) frío, y agitando energicamente en un Vibromixer. Estas operaciones se llevan a cabo a baja temperatura (4°C).

Para separar las membranas del lisado, se siembra éste en una solución de sacarosa 27% (p/v),  $d = 1,106$ , centrifugando después en un rotor swing-out (MSE SW 25) a  $63.500 \times g$  durante 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las membranas aparecen formando una banda estrecha en la interfase de sacarosa (0,25-0,8M), quedando en la parte superior las proteínas solubles y en la inferior, plaquetas sin romper, gránulos, mitocondrias, etc, como se puede ver en la Lámina I.

La banda de membranas se aísla con mucho cuidado, se diluye aproximadamente a 1:10 en Tris-sacarosa y se centrifuga a  $105.000 \times g$  durante 1 hora.

El sedimento de membranas se resuspende en el tampón Tris-sacarosa anteriormente utilizado a la concentración deseada, y se conserva congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

Un esquema del conjunto de las distintas etapas de preparación de plaquetas y aislamiento de membranas se muestra en el Esquema 3.

### II.3. TECNICAS DE CARACTERIZACION DE MPPH

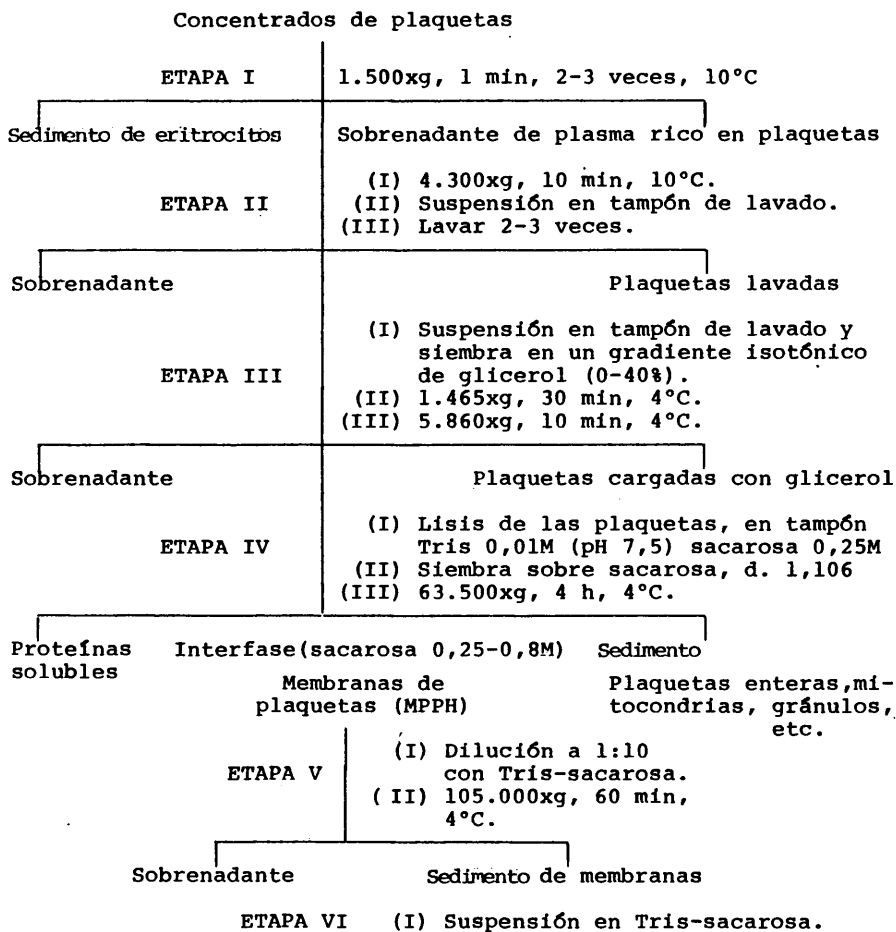
#### II.3.1. Determinación de actividad enzimática. Fosfodiesterasa (EC 3.1.4.1)

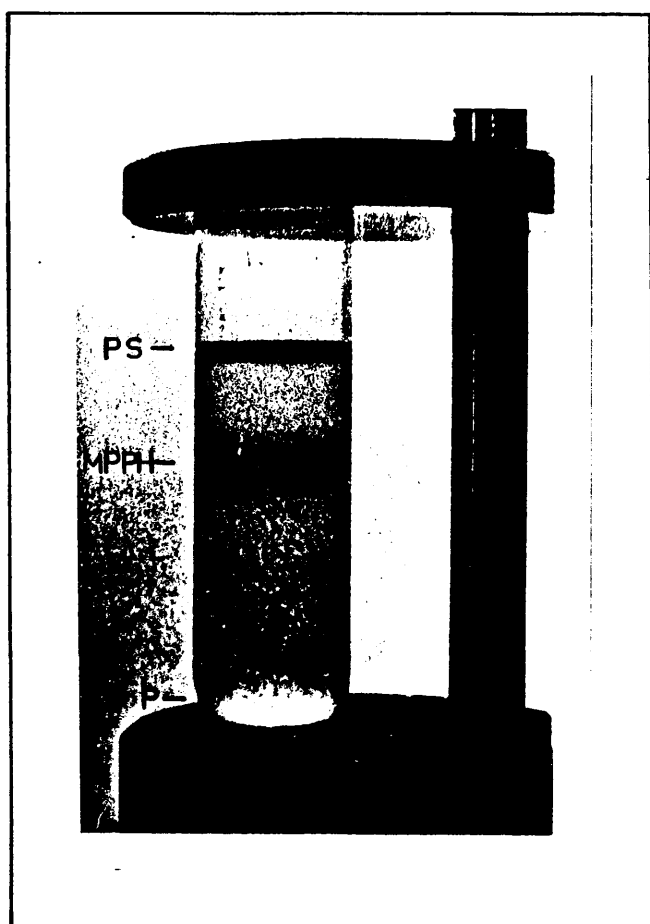
Se sigue el método de Koerner (2) con ligeras modificaciones.

El ensayo se realiza a pH 5,5 y  $37^{\circ}\text{C}$  midiéndose a 400 nm la liberación de p-nitrofenol a partir de bis(p-nitrofenil)fosfato utilizado como sustrato.

ESQUEMA 3

Aislamiento de membranas plasmáticas de plaquetas humanas.





LAMINA 1

Fraccionamiento de plaquetas lisadas sobre  
sacarosa 27% p/v.

PS, proteínas solubles; MPPH, membranas plasmáticas.  
P, pellet (plaquetas sin romper, mitocondrias,  
gránulos, etc).

Se considera un  $\epsilon_{400}$  p-nitrofenol =  $18.300 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (3), expresándose la actividad específica en  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberados por miligramo de proteína y por hora.

#### II.3.2. Determinación de proteínas

Para determinar el contenido en proteínas de las muestras se siguió el método de Lowry (4).

Como estandar se empleó seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, cristalizada y liofilizada) en solución acuosa, a una concentración de 2 mg/ml. El contenido aparente de los estándares de BSA, obtenido gravimétricamente, se corrigió por el obtenido espectroscópicamente, teniendo en cuenta que  $\epsilon_{278} = 6,38 \text{ dl.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (5); estas diferencias se deben sobre todo a hidratación de BSA.

Como en muchos casos las muestras a analizar contenían SDS, y éste hace disminuir la absorción tanto a 500 nm como a 750 nm, se corrige el descenso, añadiendo a blanco y estándares la misma cantidad de detergente que la que contenían las muestras.

#### II.3.3. Extracción de lípidos de MPPH

Las membranas se dializan exhaustivamente frente a Tris-ClH 0,01M, pH 7,4, para eliminar la sacarosa y los lípidos se extraen con cloroformo:metanol (2:1) según el método de Bligh y Dyer (6).

La mezcla de extracción se centrifuga a  $10.000 \times g$

durante 15 min consiguiendo una nítida separación entre la fase clorofórmica que contiene los lípidos y la fase metanol-agua que contiene el material no extraíble.

La fase clorofórmica se utiliza directamente para la determinación de fósforo lipídico (ver Sección II.3.4.).

#### II.3.4. Determinación de fósforo

Se sigue básicamente el método de Bartlett (7) que es una variación del clásico de Fiske y Subbarrow (8). Antes de ser analizadas, las muestras se digieren con ácido perclórico al 60%. Al final del proceso, se mide la absorción del ácido fosfomolibdico a 830 nm.

Como patrón se empleó  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (Merck, para análisis) previamente desecado a 110°C durante 24 h y enfriado a vacío.

#### II.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE)

Se siguieron básicamente dos métodos.

Para el método de Weber y Osborn (9) se utilizan geles del 5% en acrilamida y con una relación de acrilamida a N-N'-metilenbisacrilamida de 37:1. El tamaño de los geles es de 8 cm de longitud y 6 mm de diámetro.

Previamente a ser sometidas a electroforesis, las muestras se solubilizan del siguiente modo: las muestras sin reducir se disuelven en SDS al 3%; las parcialmente reducidas se incuban en SDS al 3% más 2-mercaptoetanol al 0,5%, durante 30 min a tem-

peratura ambiente; y las muestras reducidas, se incuban durante 3 min a 100°C en SDS al 3%, más 2-mercaptoetanol al 2%.

La electroforesis se realiza en tampón fosfatos 0,1M, pH 7,2, SDS 0,1%, a temperatura ambiente y con una intensidad de corriente de 8 mA por gel durante 4-5 h.

Para el método de Laemmli (10), se utilizan geles separadores del 7% en acrilamida, y una relación de acrilamida a N-N'-metilenbisacrilamida de 36,8:1. La concentración final en los geles es Tris-ClH 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%. El tamaño de éstos es también de 8 cm de longitud y 6 mm de diámetro.

En algunas ocasiones, encima del gel de separación, se coloca un gel de concentración de 1 cm de longitud, una concentración de acrilamida del 3% y de Tris-ClH 0,125M pH 6,8, SDS 0,1%.

Las muestras sin reducir se disuelven en SDS al 3%, las parcialmente reducidas en SDS al 3% más 2-mercaptoetanol al 0,5% durante 30 min, y las reducidas o bien se incuban durante 3 min a 100°C en SDS al 3% más 2-mercaptoetanol al 2% o durante 1 h a 37°C en SDS al 3% y mercaptoetanol al 5%.

La electroforesis se realiza en tampón Tris-ClH 0,025M, glicina 0,192M, pH 8,3, SDS 0,1%, a temperatura ambiente y con una intensidad de corriente de 3 mA por gel durante 4,5-5 h.

Como marcador de frente se utiliza azul de bromofenol al 0,05% p/v, en glicerol al 50% v/v; el glicerol se emplea para incrementar la viscosidad de la muestra y permitir que forme una capa estable entre gel y tampón.

Los geles se tiñen para proteínas totales con azul brillante de Coomassie al 0,25% en metanol al 45% (v/v) y ácido acético glacial al 5% (v/v) durante 1 h.

Para tinción de glicoproteínas se utiliza el método de Zacharius et al (11), que es una variante de la clásica tinción PAS (ácido periódico-Reactivo Schiff), introducida por Koiw y Gronwall (12), que consiste en la fijación de las proteínas con ácido tricloroacético seguido de una oxidación con ácido periódico, que posteriormente se elimina de los geles lavando éstos abundantemente con agua destilada durante toda una noche. Al día siguiente los geles se incuban durante 50 min en la oscuridad en el reactivo Schiff (formado por fuchsina Merck al 0,5% en metabisulfito al 1%, ClH 0,07N), y son posteriormente lavados tres veces (10 min cada una) con metabisulfito al 0,5%.

El exceso de colorante de los geles se elimina por difusión, empleando como solución decoloradora metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) en agua.

Una vez desteñidos los geles, se conservan en una disolución de ácido acético al 7%.

Por último, se densitometran en un microdensitómetro Joyce Loebel modelo MK IIIC de doble haz, obteniendo densitogramas en los que cada banda electroforética está representada por un pico, cuya área es relativamente proporcional a la cantidad de proteína que contiene. Midiendo la distancia del máximo de cada pico al origen, se obtiene la movilidad electroforética. Si ésta se relaciona con la movilidad del frente se determina la movili-

dad relativa.

El SDS se une muy fácilmente a las proteínas formando complejos proteína-SDS cuya carga superficial es casi enteramente debida a la de los iones sulfato expuestos, existiendo una relación casi lineal entre la movilidad electroforética de estos complejos y el logaritmo de la masa molecular de la proteína (13) (14). Como proteínas estándar se han utilizado: seroalbúmina bovina BSA (Sigma) trímero 204.000, dímero 136.000, monómero 68.000; ovoalbúmina (Sigma) 43.000, y las cadenas A $\alpha$  (68.000), B $\beta$  (57.000) y  $\gamma$  (48.000) procedentes de la reducción de fibrinógeno humano. Los estándares se trataron igual que las muestras previamente a su utilización.

#### II.4. SOLUBILIZACION DE MPPH

##### II.4.1. Métodos químicos. Detergentes

Se utilizó una sal biliar, desoxicolato sódico (DchNa) y un detergente aniónico, dodecil sulfato sódico (SDS).

Partiendo de una suspensión de MPPH en Tris-ClH 0,01M (pH 7,5), sacarosa 0,25M, se toman alícuotas de 1 ml con una concentración de 2 mg de proteína/ml. A éstas se les añade detergente en cantidades crecientes y se incuban, bien durante 90 min, bien toda la noche a temperatura ambiente (22°C), centrifugando finalmente a 160.000xg durante 90 min a 22°C.

Se considera soluble lo que permanece en el sobrenadante después de los 90 min de centrifugación, y el porcentaje de solubilización se calcula determinando el contenido proteico en

sedimentos y sobrenadantes mediante el método de Lowry (4).

#### II.4.2. Métodos físicos. Ultrasonidos

Se parte de membranas (MPPH) en Tris-ClH 0,01M, pH 7,4, sacarosa 0,125M.

Se toman alícuotas de 2 ml que contienen 5 mg de proteína de MPPH y se sonicán durante 30 seg en un Ultrasonic Power Unit MSE (20 KHz) operando a la máxima potencia; esta operación se realiza en un baño de hielo.

Los sonicados se centrifugan a 160.000xg durante 90 min a 4°C. Se separan sobrenadante y sedimento, a los que se determina su contenido en proteínas (4), y se someten a análisis de SDS-PAGE tiñendo tanto para proteínas totales como para glicoproteínas.

#### II.5. TÉCNICAS DE PURIFICACION DE GP IIIa

##### II.5.1. Solubilización de los sedimentos de sonicación

Los sedimentos procedentes de las membranas sonicadas se solubilizan con SDS al 3% p/v durante toda una noche a temperatura ambiente.

La solubilización es prácticamente del 100%. Los sedimentos solubilizados se dializan frente al tampón de elución usado en cromatografía, para eliminar el exceso de SDS, y se filtran previamente a su paso por columna.

##### II.5.2. Cromatografía de exclusión

Esta técnica se utiliza para fraccionar, por tamaño mo-

lecular, los sedimentos de sonicación solubilizados con SDS.

Se realizaron fraccionamientos con diferentes geles (Sephadex G-150, Sephadex G-200, Sepharosa 4B, Sepharosa 6B, ...), distintos tamaños de columnas, etc (estudio que puede verse en la Sección III.3.1 de Resultados), pero las condiciones que se han considerado más favorables y que se utilizaron rutinariamente en los últimos fraccionamientos son las siguientes:

Los sedimentos de sonicación previamente solubilizados, dializados y filtrados, conteniendo alrededor de 50 mg de proteína en un volumen entre 5 y 7 ml, se siembran en una columna de Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) (2,5x100 cm) con adaptadores de flujo, equilibrada con tampón de elución: ClNa 0,25M, fosfatos 0,02M, azida sódica 0,02%, pH 7,2, conteniendo SDS al 0,05%. Todas las operaciones de empaquetado de columna, elución, etc, se realizan a temperatura ambiente (22°C) para evitar que precipite el SDS.

La absorción del eluato se midió a 280 nm bien continuamente utilizando una célula de flujo, o bien manualmente en un espectrofotómetro, en las fracciones de 4-6 ml recogidas.

Las distintas fracciones se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones ricas en GPIIIa pero con una cantidad apreciable del resto de las glicoproteínas, se mezclan, se concentran y se dializan durante una noche frente al tampón de elución y se vuelven a cromatografiar en una columna de (1,5x90 cm) de Sephacryl 300 o Sepharosa 6B (Pharmacia), indistintamente, equilibrada con tampón de elución. Las fracciones recogidas son de 3 a 4 ml, mi-

diéndose su  $A_{280}$  y analizándose mediante SDS-PAGE. De esta cromatografía se logran aislar fracciones muy enriquecidas en GPIIIa y por tanto adecuadas para ser sometidas a cromatografía de afinidad.

### II.5.3. Cromatografía de afinidad

Como última etapa en la purificación de la GPIIIa, las muestras procedentes de fraccionamientos previos en Sepharosa 4B y Sephacryl 300 (ver Sección II.5.2., cromatografía de exclusión), que se caracterizan por un alto contenido en GPIIIa, una ausencia casi total del resto de las glicoproteínas y presentando contaminaciones de especies proteicas de masa molecular menor que GPIIIa, se cromatografían sobre Con A-Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) o sobre Con A-Sepharosa 6B preparada en el laboratorio (ver Sección II.5.3.1).

El tamaño de las columnas varió en las distintas etapas del trabajo; al principio se emplearon columnas pequeñas (1x20 cm), pasando a columnas de (1,5x40 cm) una vez conocidas las condiciones idóneas de trabajo.

Previamente a la aplicación de la muestra, se lava abundantemente la columna con tampón de elución para eliminar la Con A no unida a la Sepharosa y la que se desprende de ésta por efecto del SDS.

Las muestras conteniendo generalmente entre 5 y 10 mg de proteína en un volumen variable, se eluyen de la columna con al menos un volumen de tampón de elución igual al volumen total

de la columna. Una vez la  $DO_{280}$  es de 0,01-0, se comienza la elución de la columna con 5% de  $\alpha$ -metil-D-manosa o  $\alpha$ -metil-D-glucosa en tampón de elución hasta que se desprende todo el material retenido en la columna.

Después de la elución de la glicoproteína, la columna se lava con el tampón de elución, y se mantiene en este medio hasta su utilización posterior. La columna puede emplearse hasta 5 veces sin pérdida de eficiencia en la capacidad de retención de la GP IIIa.

#### II.5.3.1. Activación de Sepharosa con CNBr y su unión a Con A

Se siguió básicamente el método propuesto en (15). El proceso consta de dos partes:

I) Activación de la Sepharosa 6B con bromuro de cianógeno (CNBr).

II) Unión de la Con A.

I) A una suspensión de 75 ml de Sepharosa 6B en un volumen igual de agua destilada, tras ser llevada a pH 10,5 con NaOH 0,2M, se le añade una solución de 1,5 g de CNBr en 30 ml de agua destilada y se mantiene con agitación suave a temperatura ambiente y a pH constante de 10,5 mediante adición continua de NaOH 0,2M durante 10 minutos.

Al cabo de los 10 minutos se pasa la suspensión de Sepharosa a un embudo Buchner y se lava con 750 ml de agua destilada fría, seguido de otro lavado con 750 ml de acetato sódico

0,1M pH 6,8, también frío. Estas operaciones se realizan cuidadosamente en vitrina, y además la habitación debe estar muy bien aireada.

En el fondo del kitasato se pone un exceso de NaOH y  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para la descomposición del CNBr y formación del cianuro de cobre insoluble.

II) Se cierra el extremo del embudo con Parafilm y se le añade a la Sepharosa ya activada una solución de 150 mg de Con A en 75 ml de acetato sódico 0,1M pH 6,8 conteniendo ClNa 0,15M.

La mezcla se pasa a un recipiente adecuado y se deja con agitación suave toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lava con 1 litro de ClNa 1M conteniendo  $\text{Cl}_2\text{Ca } 10^{-3}\text{M}$  y  $\text{Cl}_2\text{Mn } 10^{-3}\text{M}$ , eliminándose así la Con A que no se ha unido a la Sepharosa, lo que se controla mediante medida de la absorción a 280 nm de las soluciones de lavado.

Esta preparación se guarda en frío con ClNa 1M hasta su utilización.

## II.6. TECNICAS DE CARACTERIZACION DE GP IIIa

### II.6.1. Preparación de la muestra previamente al análisis

La GP IIIa purificada, antes de ser analizada químicamente, se dializa exhaustivamente frente a agua destilada conteniendo azida sódica al 0,02%, en una cámara a 4°C. Esta operación se realiza durante 3 semanas como mínimo, y tiene por

objeto eliminar el detergente (SDS) y evitar interferencias en los análisis.

#### II.6.2. Análisis de aminoácidos

Se realizan en autoanalizador de aminoácidos LKB modelo 3201. Las muestras a analizar de aproximadamente 60 µg de protefna (según Lowry), se suspenden en 1 ml de ClH 6N y una vez desgasificadas a  $10^{-5}$  mm Hg mediante 3 ciclos de congelación-descongelación, se hidrolizan durante 24 h a 105°C (16).

Finalizado el proceso, las muestras se llevan a sequedad en un rotavapor, se disuelven en el tampón de muestra y se aplican al analizador.

El contenido en triptófano se determina por el método espetrofotométrico de Edelhoch (17), adaptado a muestras en SDS por Koziarz et al (18) utilizando los siguientes coeficientes de extinción para triptófano:  $\epsilon_{290} = 5185$  y  $\epsilon_{275} = 5679$  l cm<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>.

#### II.6.3. Análisis de azúcares

##### II.6.3.1. Análisis colorimétricos

###### A) Análisis de hexosas

Se sigue el método de Dubois et al (19), que básicamente consiste en la reacción del azúcar en cuestión con fenol, en presencia de ácido sulfúrico, dando origen a un color amarillo-naranja cuya absorción se mide a 490 nm.

Como estandar se utilizó D-galactosa.

#### B) Análisis de hexosaminas

El contenido total de hexosaminas se determinó por el método de Elson-Morgan, modificado por Gatt y Berman (20), previa hidrólisis de las muestras en ClH 2N a 100°C durante 12 h.

Como estandar se utiliza una mezcla equimolar de D-glucosamina-ClH y D-galactosamina-ClH.

#### C) Análisis de ácidos siálicos

El contenido en ácidos siálicos se determinó después de haber hidrolizado las muestras en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1N a 80°C durante 1 h, por el método de Warren (21).

Como estandar se utiliza ácido N-acetil-neuramínico.

#### II.6.3.2. Determinación de hexosas individuales por cromatografía gaseosa

Se siguió el método propuesto por Reinhold en (22) con ligeras modificaciones y consiste en:

Metanolisis de muestras de glicoproteína de alrededor de 100 µg de proteína (según Lowry), junto con 20 µg de mioinositol como estandar interno en tubos bien cerrados, con 2 ml de ClH 0,5N en metanol anhidro durante 16 h a 65°C.

Las muestras metanolizadas se evaporan bajo corriente de nitrógeno, y la N-acetilación de los grupos amino libres, se efectúa suspendiendo el residuo en una mezcla de 0,2 ml de piridina anhidra y 0,2 ml de anhídrido acético. Al cabo de 15 min las muestras se evaporan bajo corriente de nitrógeno. Para invertir la O-acetilación, las muestras se someten a metanolisis a re

flujo en 4 ml de ClH 0,5N en metanol anhidro durante 1 h.

Tras su evaporación, las muestras se derivatizan con un reactivo silanizante, que contiene piridina, hexametildisilazano y trimetilclorosilano en una proporción de 1:0,2:0,1 respectivamente, durante 30 min. Mediante esta derivatización se convierten todos los carbohidratos en sus O-trimetilsilil (O-TMS) derivados.

Por último se evapora el reactivo de silanización bajo corriente de nitrógeno y se añade heptano para disolver los éteres O-TMS.

Como estándares se utilizaron D-glucosa, D-galactosa y D-manosa, siempre con mioinositol como estandar interno, y recibieron igual tratamiento que la muestra.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 7600A; una columna metálica de 2 m de longitud y 2,2 mm de diámetro interno, de OV-17 al 4,5% en Chromosob G 80-100, trabajando isotérmicamente a 180°C; un flujo de gas portador nitrógeno, de 30 ml/min y utilizando un detector de llama.

#### II.6.4. Análisis de SDS ligado

Para determinar la cantidad de SDS que permanece ligado a la proteína después de los 21 días de diálisis frente a agua destilada, se sigue el método recientemente propuesto por Saraste y Korhonen (23), que se basa en la metanolisis del grupo sulfato en metanol ácido y la determinación por cromatografía de gases del dodecanol que se libera.

Para ello, a las muestras para análisis, se les añade

ácido mirístico como estandar interno y ClH 0,5N en metanol anhidro en ampollas cerradas bajo nitrógeno y se metanolizan durante 7 h a 70°C.

El dodecanol resultante se extrae tres veces con cloroformo, las fases clorofórmicas se juntan y se evaporan con nitrógeno a 20°C y el residuo se disuelve en 50 λ de hexano frío.

#### II.6.5. Determinación del volumen específico parcial

El volumen específico parcial de la GP IIIa se calculó a partir de la composición centesimal, los volúmenes específicos de hexosas, hexosaminas (0,613 y 0,666 respectivamente (24)) y el volumen específico medio de aminoácidos, calculado teniendo en cuenta la composición de aminoácidos de la parte proteica de la glicoproteína.

Este último se calcula según la fórmula dada en (25)

$$V_p = \frac{\sum_i V_i W_i}{\sum_i W_i}$$

siendo:  $V_p$ : volumen específico parcial.

$W_i$ : % en peso del residuo de aminoácido i.

$V_i$ : volumen específico del aminoácido i.

#### II.6.6. Determinación de coeficientes de sedimentación por ultracentrifugación analítica

Los experimentos de ultracentrifugación se realizaron en una ultracentrífuga analítica Beckman modelo E, con scanner fotoeléctrico, a una velocidad de 60.000 rpm y a 20°C de temperatura

en un rotor de titanio con células de doble sector de aluminio de 12 mm de paso de luz.

Se utilizó el sistema óptico de absorción a 280 nm mediante scanner que permite registrar la variación del perfil de densidad óptica a lo largo de la célula en el transcurso de la sedimentación de la macromolécula.

Los coeficientes de sedimentación se determinaron en muestras equilibradas por diálisis, a distintas concentraciones de SDS (0,05-1%) y la concentración de la muestra osciló entre 0,06 y 0,3 mg de proteína/ml.

#### II.6.7. Microscopía electrónica

Sedimentos de MPPH y sedimentos de sonicación de MPPH se fijaron primeramente con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfatos 13 mM pH 7,3 conteniendo  $Cl_2Ca$  al 0,01%, durante 1 h 30 min a 4°C.

Después de lavadas, las muestras se fijan con  $OsO_4$  al 2% se deshidratan con soluciones de acetona de concentraciones crecientes, se tiñen con acetato de uranilo y se incluyen con Araldite.

La muestra se corta en secciones finísimas, se monta sobre rejillas cubiertas con carbón y Formvar y se examinan en un microscopio electrónico Jeol Jen 100B del servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. a cuyo personal encargado se le agradece su ayuda.

II.6.8. Espectrofotometría de absorción y emisión

La determinación del espectro de absorción ultravioleta de la GP IIIa se ha llevado a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, empleándose un espectrofotómetro Perkin Elmer/Hitachi 200.

Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrofluorímetro SLM 8000 utilizando las mismas muestras que para absorción.

II.7. BIBLIOGRAFIA

- (1) BARBER, A.J. y JAMIESON, G.A. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 6357.
- (2) KOERNER, J.F. y SINSHEIMER, R.L. (1957)  
J. Biol. Chem. 228, 1049.
- (3) DAWSON, R.H.C., ELLIOTT, D.C., ELLIOTT, W.H. y  
JONES, K.M., eds. (1969)  
en Data for Biochemical Research, pp. 452.
- (4) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y  
RANDALL, P.J. (1951)  
J. Biol. Chem. 193, 265.
- (5) REISLER, E. y EINSENBURG, H. (1969)  
Biochemistry 8, 4573.
- (6) BLIGH, H.G. y DYER, W.J. (1959)  
Can. J. Biochem. Physiol. 34, 911.
- (7) BARTLETT, G.R. (1959)  
J. Biol. Chem. 234, 466.
- (8) FISKE, C.H. y SUBBARROW, Y. (1925)  
J. Biol. Chem. 66, 375.
- (9) WEBER, K. y OSBORN, M. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 4406.
- (10) LAEMMLI, U.K. (1970)  
Nature 227, 680.
- (11) ZACHARIUS, R.M., ZELL, T.E., MORRISON, J.H. y  
WOODLOCK, J.J. (1969)  
Anal. Biochem. 30, 148.

- (12) KÖIW, E. y GRÖNWALL, A. (1952)  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 244.
- (13) SHAPIRO, A.Z., VIÑUELA, E. y MAIZEL, J.V. Jr. (1967)  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815.
- (14) ROBBARD, D., REYNOLDS, J.A. y TANFORD, C. (1972)  
J. Biol. Chem. 247, 5856.
- (15) STEINEMANN, A. y STRYER, L. (1973)  
Biochemistry 12, 1499.
- (16) MOORE, S. y STEIN, W.H. (1963)  
en Methods in Enzymology (Colowick, S.P., Kaplan, N.O.,  
eds.) Vol. VI, p. 819. Academic Press, New York.
- (17) EDELHOCH, H. (1967)  
Biochemistry 6, 1948.
- (18) KOZIARZ, J.J., KOHLER, H. y STECK, T.L. (1978)  
Anal. Biochem. 86, 78.
- (19) DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. y  
SMITH, F. (1956)  
Anal. Biochem. 28, 350.
- (20) GATT, R. y BERMAN, E.R. (1965)  
Anal. Biochem. 15, 167.
- (21) WARREN, L. (1963)  
en Methods in Enzymology (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.,  
eds.) Vol. VI, p. 463. Academic Press, New York.
- (22) REINHOLD, V.N. (1972)  
en Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N.,  
eds.) Vol. XXV,B, p. 244. Academic Press, New York.

(23) SARASTE, M. y KORHONEN, T.K. (1979)

Anal. Biochem. 92, 444.

(24) GIBBONS, R.A. (1966)

en Glycoproteins (Gottschalk, A., ed.) pp. 29. Elsevier,  
Amsterdam.

(25) ZAMYATNIN, A.A. (1972)

en Progress in Biophysics and Molecular Biology (Butler,  
J.A.V. y Noble, D., eds.) Vol. 24, pp. 109. Pergamon  
Press.

CAPITULO III.- RESULTADOS

### III.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MPPH

#### III.1.1. Aislamiento

De los métodos descritos para el aislamiento de estas membranas como son sonicación, lisis osmótica simple, homogeneización mecánica, etc (1), se ha escogido el método de lisis con glicerol (2), por ser el más satisfactorio en cuanto a menor contaminación con gránulos y mitocondrias, reproducibilidad, etc.

Las variaciones que se han introducido al método original han sido, por una parte la de mantener congelados los sedimentos cargados con glicerol, entre 1 y 3 semanas, hasta contar con una cantidad apreciable de material, y verificar el aislamiento de las membranas a partir de 30 a 40 unidades. Por otro lado, la dificultad de conseguir plaquetas frescas (de menos de 24 horas desde su extracción) motivó siempre la necesidad de trabajar con plaquetas de 3 a 7 días, dato que habrá que tener en cuenta a lo largo de todo este trabajo.

#### III.1.2. Caracterización química

A las membranas plasmáticas así obtenidas se les determinó su contenido en fosfolípidos y proteínas, obteniendo una relación fosfolípido/proteína (p/p) de 1,1 mg/mg, y una relación proteína/volumen de sangre (p/v) de 1,4 mg/unidad de sangre (450 ml).

Como enzima marcador de membrana plasmática se siguió la actividad de la enzima fosfodiesterasa, por considerarse a ésta como el marcador más específico de la superficie de estas células (2, 3). Se obtuvieron valores de actividades específicas para el lisado de 0,048  $\mu$ moles p-nitrofenol/mg proteína/hora, frente a valores de 0,245  $\mu$ moles p-nitrofenol/mg proteína/hora para membranas, lo que supone un incremento en actividad de unas 5 veces.

#### III.1.3. Caracterización ultraestructural

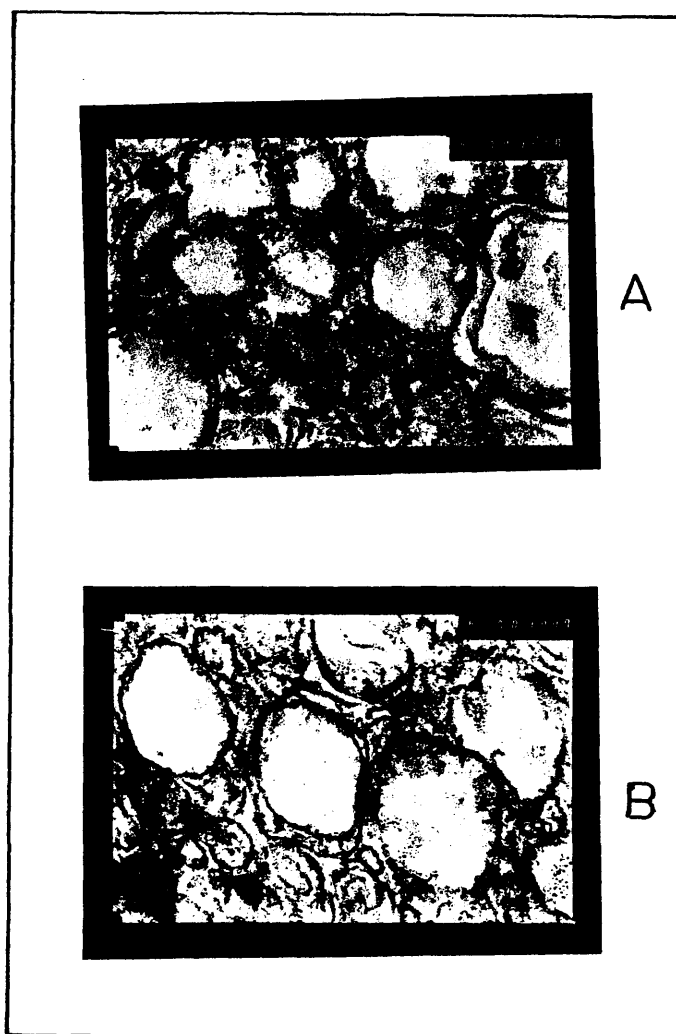
Con el fin de comprobar morfológicamente la homogeneidad y grado de contaminación de las membranas aisladas por nosotros, se estudiaron éstas por microscopía electrónica.

Se observa la preponderancia de grandes estructuras membranosas, casi desprovistas de contaminación con otros elementos subcelulares tales como gránulos o mitocondrias.

En la Lámina II se puede observar la existencia de dos tipos de vesículas, unas de mayor diámetro y con estructuras de doble membrana (II A), y otras más pequeñas con pared sencilla (II B). La existencia de estos dos tipos de vesículas había sido puesta de manifiesto previamente por Barber y Jamieson (2).

#### III.1.4. Caracterización electroforética

Los perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de MPPH, tanto para proteínas totales como para glicoproteínas son altamente dependientes de los siguientes parámetros: a) concentración de acrilamida, b) ausencia o presencia de agente reduc-



LAMINA II

Microfotografías electrónicas de MPPH (x100.000).  
A, vesículas de doble membrana (→).  
B, vesículas de pared sencilla.

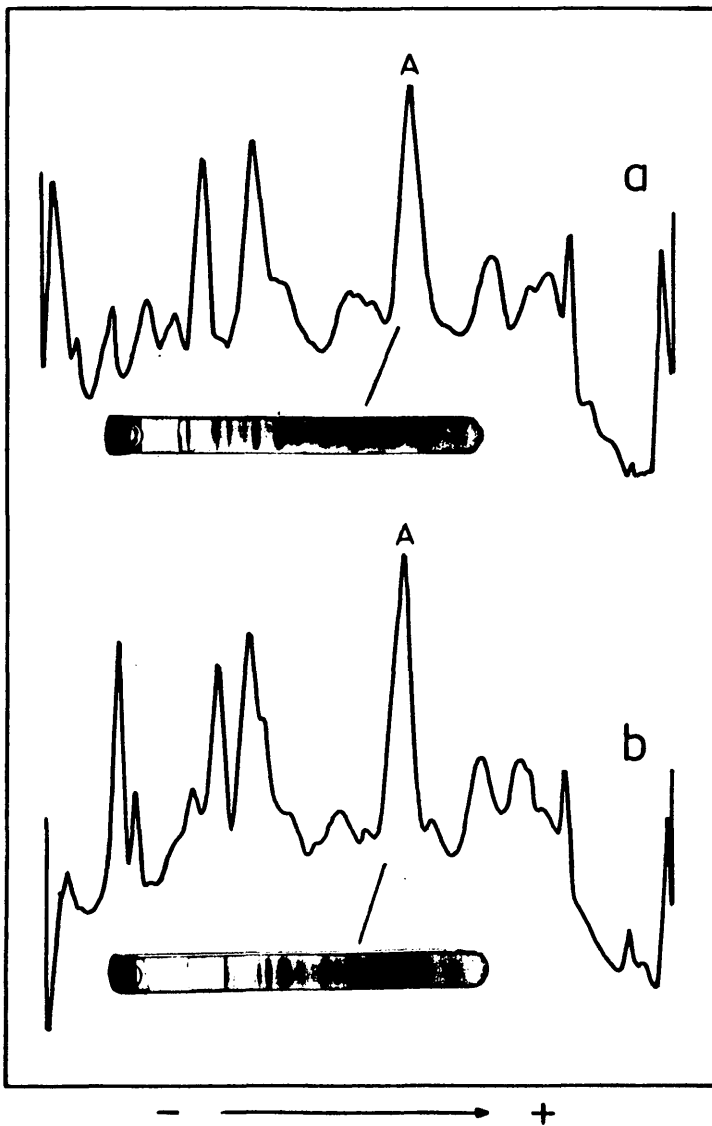
tor y concentración en éste, c) sistema de tampón utilizado en la electroforesis. Por ello es imprescindible en la exposición de resultados, la indicación de las condiciones utilizadas.

Por SDS-PAGE, tiñendo para proteínas totales, se observa que la membrana plasmática de plaquetas está compuesta de una gran variedad de polipéptidos cuyos pesos moleculares oscilan entre 350.000 y 10.000 en el estado de no reducción y entre 250.000 y 10.000 en estado reducido. En la Figura 1 se muestran perfiles electroforéticos de estas membranas. Si estos perfiles se comparan con los de plaqueta completa en condiciones similares, Figura 2, se observa que en membranas desaparecen ciertos polipéptidos, y otros se enriquecen notablemente.

Tanto en plaqueta completa como en membranas, la banda más sobresaliente corresponde a la proteína contráctil actina (A), con un peso molecular de 45.000. En membranas, las otras dos bandas más sobresalientes corresponden en ambos estados, reducido y sin reducir, a las glicoproteínas GP II y GP III, observándose un notable enriquecimiento en estas glicoproteínas respecto a plaqueta completa.

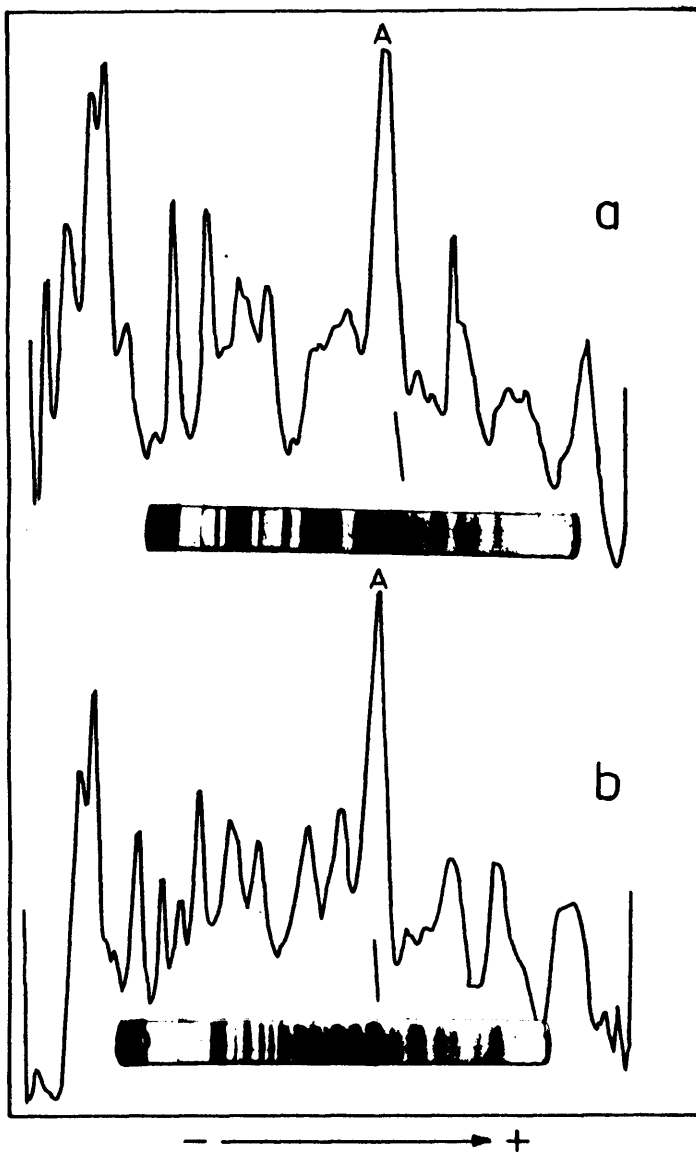
Tiñendo para carbohidratos se observa que algunas de las proteínas anteriormente vistas son glicoproteínas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 150.000 y 95.000. La plaqueta completa posee una glicoproteína que no aparece en membranas aisladas, es la denominada "trombospondina", ( $T_p$ ), que procede de la fracción granular, y fué aislada recientemente (4). Esta glicoproteína tiene un peso molecular de 450.000 en estado no reducido, y se transforma mediante reducción en un componente de peso mole-

73



**FIGURA 1**

Perfiles electroforéticos de MPPH.  
a, sin reducir; b, reducida.  
Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%.  
Tinción para proteínas totales. A, actina.



**FIGURA 2**

Perfiles electroforéticos de plaqueta completa.  
a, sin reducir; b, reducida.  
Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%.  
Tinción para proteínas totales. A, actina.

cular 150.000, que migra en la zona de la GP I (Figura 3).

En cuanto a las glicoproteínas de MPPH, principal objetivo de este trabajo, la nomenclatura con la que se identifican las distintas bandas electroforéticas en la bibliografía es equívoca debido, como se mencionó anteriormente, a las variaciones que experimentan en su movilidad según las condiciones de trabajo.

En la presente investigación la electroforesis se realizó siguiendo dos procedimientos diferentes (sección II.3.5). El más ampliamente utilizado fue el que usa tampón fosfatos y una concentración de acrilamida en los geles del 5%. Las muestras se analizaron en condiciones de no reducción y de reducción parcial o total. Así en estado de no reducción pueden observarse (Figura 4) las glicoproteínas denominadas GP Ia, GP Ib, GP IIa y GP III, mientras que en estado de reducción total la GP Ia y GP Ib migran juntas en la posición de la GP Ib, la GP IIa se transforma en GP Iib y la GP III permanece invariable.

Se realizó un experimento encaminado a demostrar la transformación de la GP IIa en GP Iib. La muestra utilizada procedía de un fraccionamiento por tamaño y consistía casi exclusivamente de GP IIa, como se determinó en su análisis por SDS-PAGE (sin reducción), y posterior tinción para proteínas totales. Esta fracción se sometió a reducción total y parcial, y los resultados obtenidos pueden verse en la Figura 5. En ella se ve como la GP IIa se transforma en GP Iib pasando por un estado intermedio donde aparecen las dos especies.

Los cambios que experimentan las glicoproteínas en estas

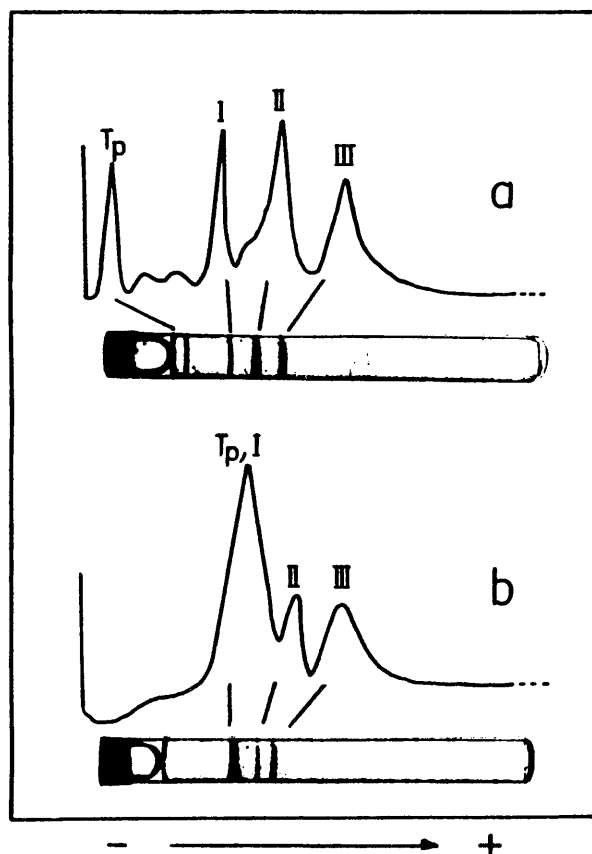
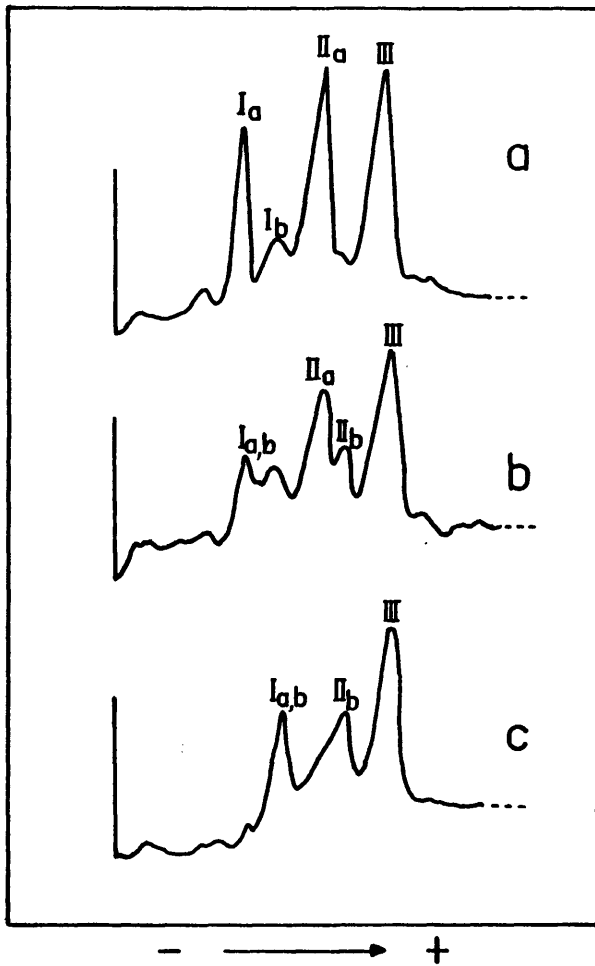


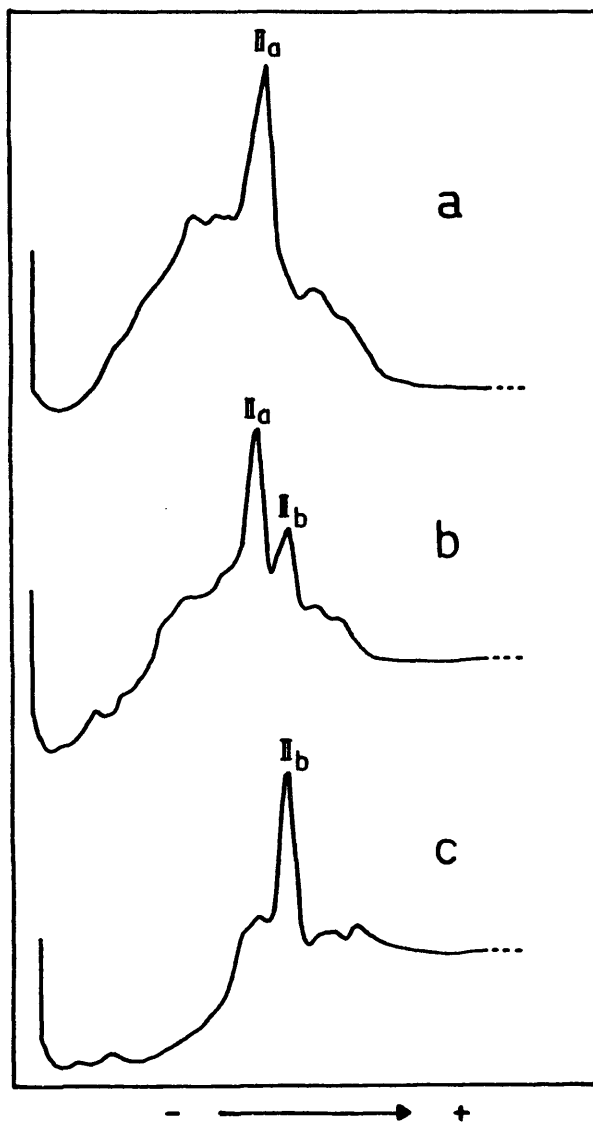
FIGURA 3

Perfiles electroforéticos de las glicoproteínas de plaqueta completa. a, sin reducir; b, reducida. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para glicoproteínas. Tp, trombospondina; I, GPI; II, GPII; III, GPIII.



**FIGURA 4**

Perfiles electroforéticos de las glicoproteínas de MPPH. a, sin reducir; b, reducción parcial; c, reducción total. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para glicoproteínas.



**FIGURA 5**

Perfiles electroforéticos de la GPII de MPPH.  
a, sin reducir; b, reducción parcial;  
c, reducción total.  
Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%.  
Tinción para proteínas totales.

condiciones de SDS-PAGE se resumen a continuación en la Tabla II.

TABLA II

|                   | Zona GP I    | Zona GP II     | Zona GP III |
|-------------------|--------------|----------------|-------------|
| No reducción      | GP Ia, GP Ib | GP IIa         | GP III      |
| Reducción parcial | GP Ia, GP Ib | GP IIa, GP IIb | GP III      |
| Reducción total   | GP Ia,b      | GP IIb         | GP III      |

Si estas mismas glicoproteínas se analizan por SDS-PAGE en un sistema de tampón Tris-glicina y con una concentración en acrilamida del 7% observamos que la situación varía notablemente.

Lo más interesante de la utilización de este sistema es el desdoblamiento de la banda de GP III con la reducción, en dos especies que denominaremos GP IIIa y GP IIIb. Esto puede verse en la Figura 6. La GP IIIb migra en la misma posición en geles reducidos y sin reducir, y apenas se tiñe para proteínas totales. Al contrario, la GP IIIa disminuye su movilidad electroforética con la reducción y se tiñe relativamente con más intensidad para proteínas totales que para glicoproteínas. Esta proteína fué la aislada y caracterizada por nosotros y tendremos ocasión de hablar ampliamente de ella a lo largo de esta exposición.

Por otro lado, este sistema resuelve mucho peor los diferentes componentes de las bandas de glicoproteínas de menor movilidad, por lo que se denominarán GP I y GP II sin diferenciar en a ó b.

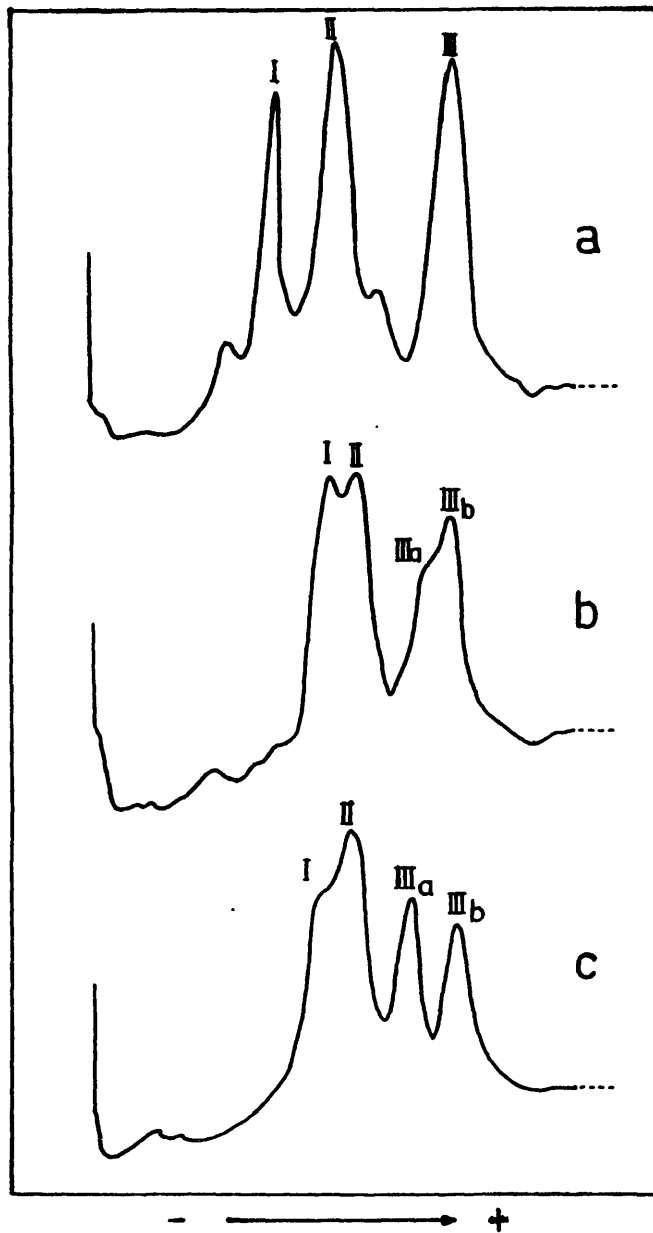


FIGURA 6

Perfiles electroforéticos de las glicoproteínas de MPPH.  
 a, sin reducir; b, reducción parcial; c, reducción total.  
 Electroforesis en tampón Tris-glicina. Geles del 7%.  
 Tinción para glicoproteínas.

En cuanto a lo que sucede con proteínas totales, los resultados se muestran en la Lámina III. En ella se señala el lugar de las diferentes glicoproteínas.

En los geles 1, 2 y 3 puede verse claramente la transformación de la GP IIa en GP IIb pasando por un estado intermedio (gel 2), donde se encuentran las dos especies.

En los geles 1', 2' y 3' se observa como la GP II aumenta su movilidad electroforética con la reducción y la GP IIIa en cambio la disminuye.

Se observa por otra parte como la GP IIIa se tiñe muy intensamente, al contrario de la GP IIIb que apenas lo hace.

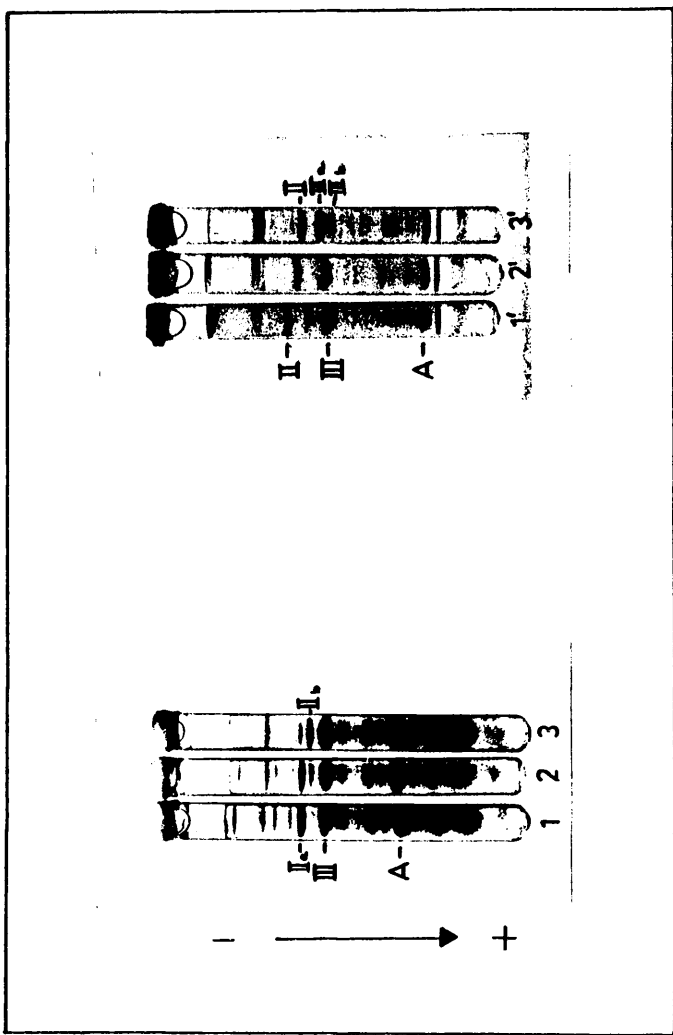
### III.2. SOLUBILIZACION DE MPPH

#### III.2.1. Solubilización por detergentes

La solubilización de MPPH se ensayó con los detergentes SDS y DchNa.

Se comenzó utilizando DchNa debido a su menor poder desnaturalizante. Para el estudio de solubilización se realizaron experimentos manteniendo constante la cantidad de proteína y variando la cantidad de detergente en un rango de 0,25-5% p/v.

Una curva de solubilización representando el tanto por ciento de proteína solubilizada en función de la cantidad de detergente a temperatura ambiente puede verse en la Figura 7, mostrando un máximo de solubilización del 83% para una cantidad de DchNa del 1,5% p/v y una relación de proteína/detergente de 1/7,5 (p/p). A partir de este punto no varía el porcentaje de



LAMINA III

SDS-PAGE de MPPH. 1,1' sin reducir; 2,2' reducción parcial; 3,3' reducción total. 1,2,3 Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. 1'2'3' Electroforesis en tampón Tris-glicina. Geles del 7%. Tinción para proteínas totales. (A, actina; Iia, GPIIa; Iib, GPIIb; IIIa, GPIIIa; IIIb, GPIIIb).

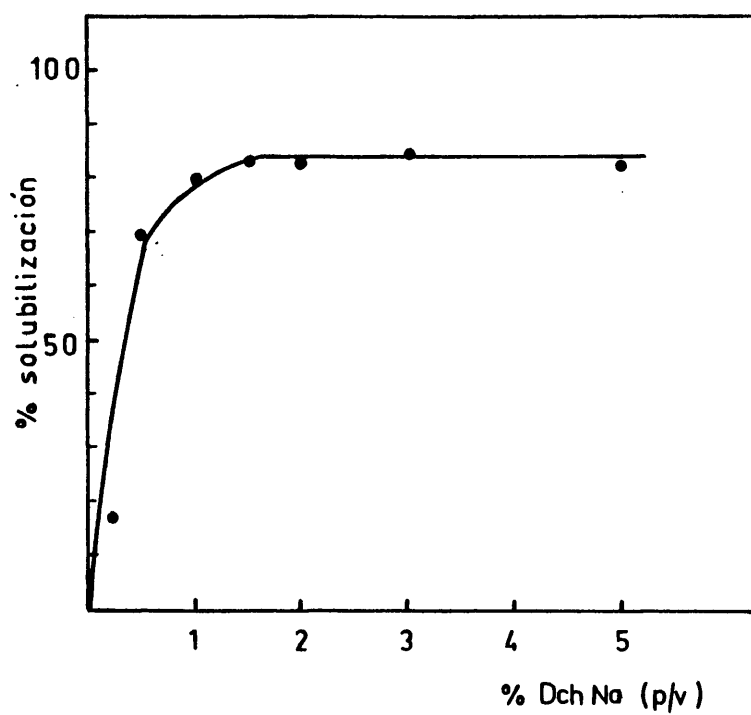


FIGURA 7

Isoterma ( 22°C) de solubilización de MPPH  
(2 mg/ml) con DchNa.

solubilización, aunque se incremente la cantidad de detergente. Por otra parte, este porcentaje tampoco varía aunque la incubación con detergente tenga lugar durante toda la noche en lugar de sólo 90 minutos.

Con el fin de determinar si el DchNa solubiliza selectivamente alguna glicoproteína de membrana, se analizaron por electroforesis el sobrenadante y el pellet procedentes de la solubilización de membranas con DchNa al 0,5% p/v.

Los resultados, mostrados en la Figura 8, indican que se solubilizan todas las glicoproteínas aunque no en la misma proporción.

En la Figura 9 puede verse una curva de solubilización a temperatura ambiente (22°C) con SDS. La concentración de las muestras de MPPH era de 2 mg/ml de proteína, y la cantidad de SDS osciló entre 0,1 y 5% p/v.

Se observa un máximo de solubilización del 95% para una cantidad de SDS del 3% p/v, y a partir de ese punto no aumenta el porcentaje de solubilización aunque se incremente la cantidad de detergente. Tampoco aquí el aumento del tiempo de incubación de 90 min a 12 h aumentó el grado de solubilización.

Como era de esperar, el análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubilizada y sin solubilizar no revela ninguna diferencia entre ambas.

### III.2.2. Solubilización por ultrasonidos

Con objeto de eliminar en lo posible las proteínas periféricas o extrínsecas y enriquecer en glicoproteínas intrínsecas

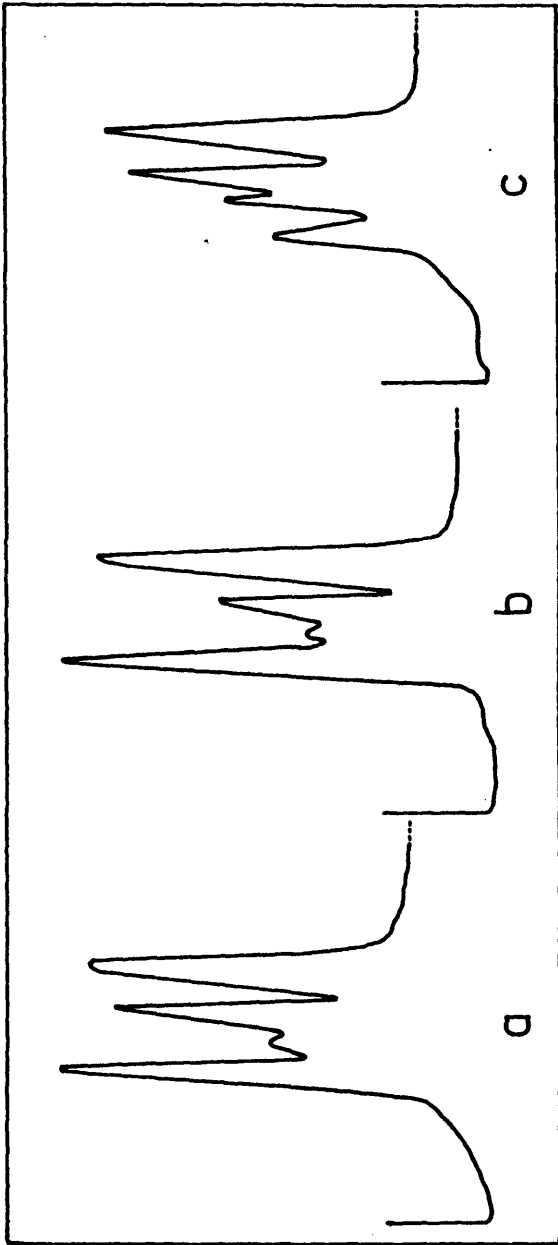


FIGURA 8

Perfiles electroforéticos de:  
a, MPPH control; b, sobrenadante de solubilización con DchNa; c, sedimento  
de solubilización con DchNa. Muestras reducidas.  
Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para glicoproteínas.

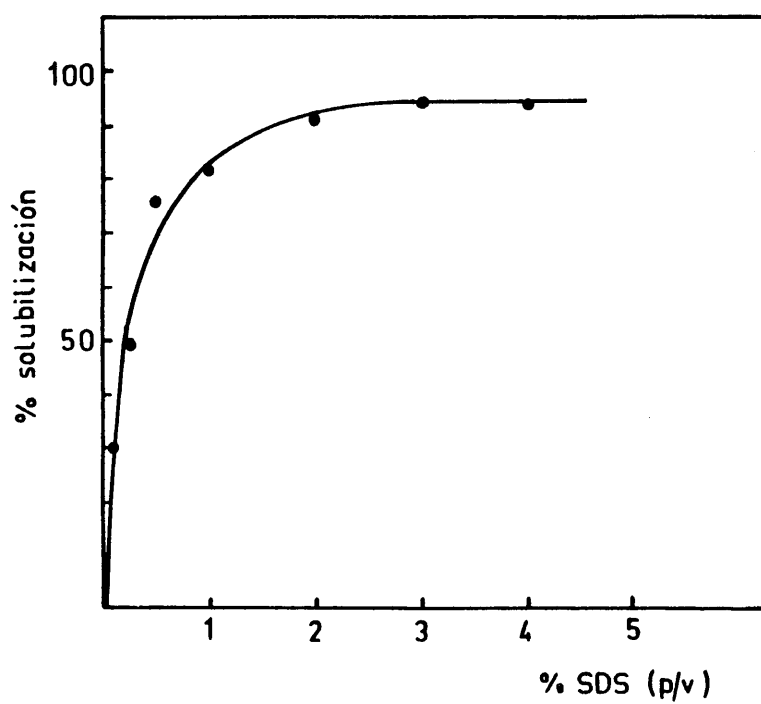


FIGURA 9

Isoterma (22°C) de solubilización de MPPH  
(2 mg/ml) con SDS.

las preparaciones de MPPH, éstas se sometieron a irradiación con ultrasonidos.

Analizando el contenido en proteínas de sedimento y sobrenadante de sonicación se observa que en todos los casos la solubilización es del  $27\% \pm 1$ , permaneciendo invariable la cantidad de material solubilizado al aumentar el tiempo de irradiación de 0,5 a 10 min.

A este material solubilizado se le determinó su contenido en fosfolípidos y se obtuvo una relación de fosfolípido a proteína de aproximadamente  $490 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteína, relación mucho menor que la obtenida para membrana completa.

Estos sobrenadantes fueron sometidos también a ultracentrifugación analítica a 40.000 y 53.000 rpm, midiéndose un coeficiente de sedimentación de 13,5 S.

Para determinar el tipo de proteínas existentes en sedimento y sobrenadante, las dos fracciones se analizaron por SDS-PAGE, tiñéndose tanto para proteínas totales como para glicoproteínas (Figuras 10 y 11, respectivamente).

Respecto a proteínas totales (Figura 10), se ve que se solubiliza una gran parte de actina y proteínas de peso molecular alto, quedando los sedimentos casi ausentes de proteínas de peso molecular mayor de 150.000.

En cuanto a las glicoproteínas (Figura 11), puede observarse que la solubilización es bastante selectiva, es decir, aparece en el sobrenadante sobre todo GP I (GP Ib), que casi llega a desaparecer en el sedimento; en éste, sin embargo, se observa sobre todo un enriquecimiento de GP II (a y b) y GP III.

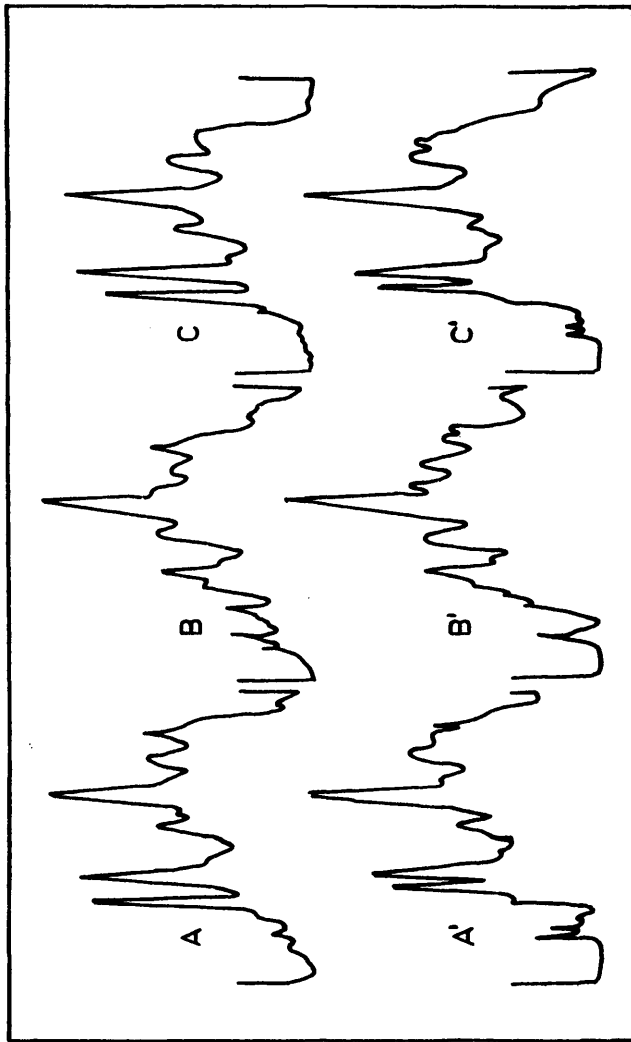
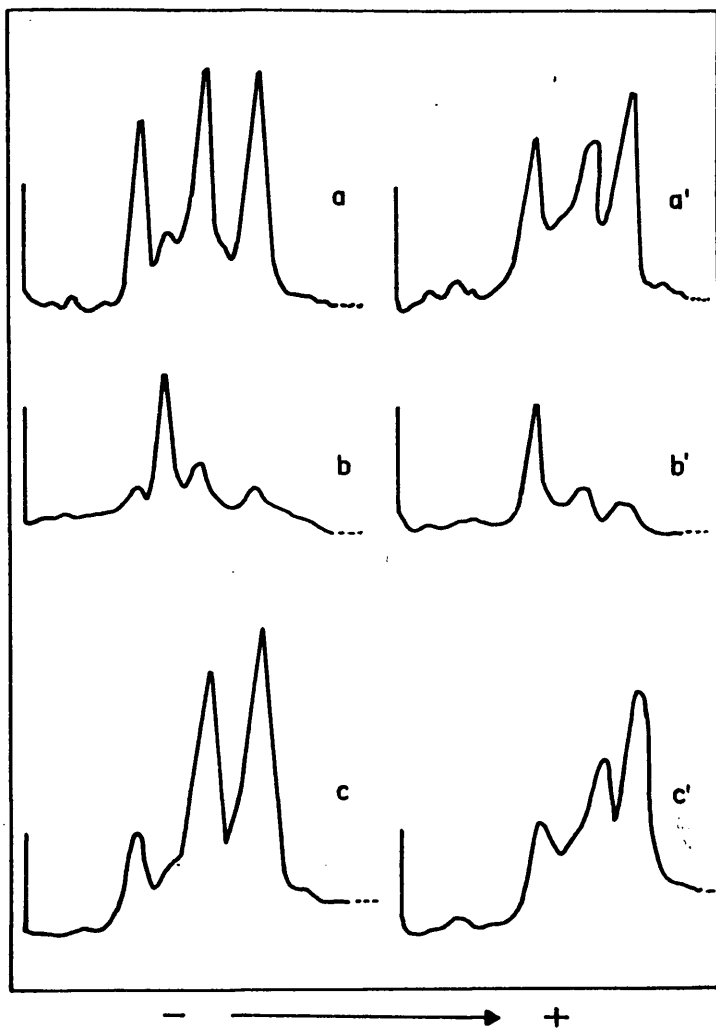


FIGURA 10

Perfiles electroforéticos de A,A' MPPH control; B,B' sobrenadante de sonicación; C,C' sedimento de sonicación. A,B,C sin reducir; A'B'C' reducidas. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.



**FIGURA 11**

Perfiles electroforéticos de:  
 a, a', MPPH control; b, b', sobrenadante de sonicación;  
 c, c', sedimento de sonicación; a, b, c, sin reducir;  
 a', b', c', reducidos.  
 Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%.  
 Tinción para glicoproteínas.

Los sedimentos de sonicación se examinaron por microscopía electrónica y como puede verse en la Lámina IV, se observan membranas rotas y degradadas y la casi desaparición de las estructuras vesiculares. Las vesículas que todavía permanecen después de la sonicación de 30 seg, son de menor tamaño que aquellas observadas en membrana no irradiada (Lámina II).

### III.3. AISLAMIENTO DE LA GP IIIa

#### III.3.1. Cromatografía de exclusión

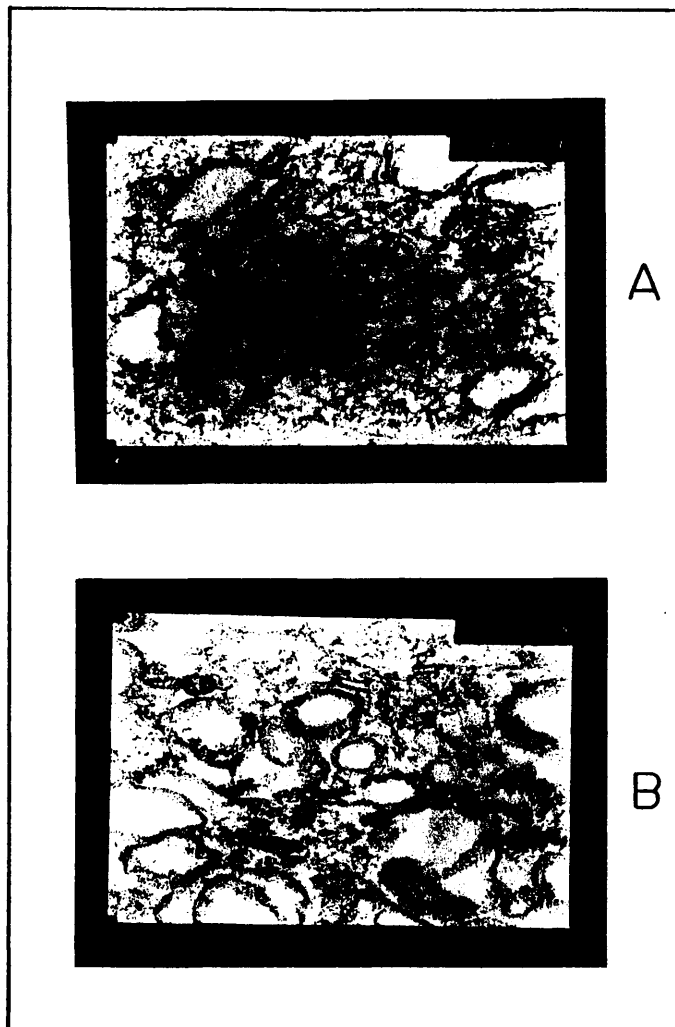
Se utilizó este método como primera etapa en la purificación de GP IIIa para fraccionar, según los diferentes tamaños moleculares, los sedimentos solubilizados obtenidos después de haber sonificado las membranas.

Al comienzo del trabajo se efectuó la selección de los geles, tamaño de columnas, etc, más eficientes para nuestro caso, lo que se describe a continuación.

Posteriormente se expondrá el procedimiento finalmente adoptado.

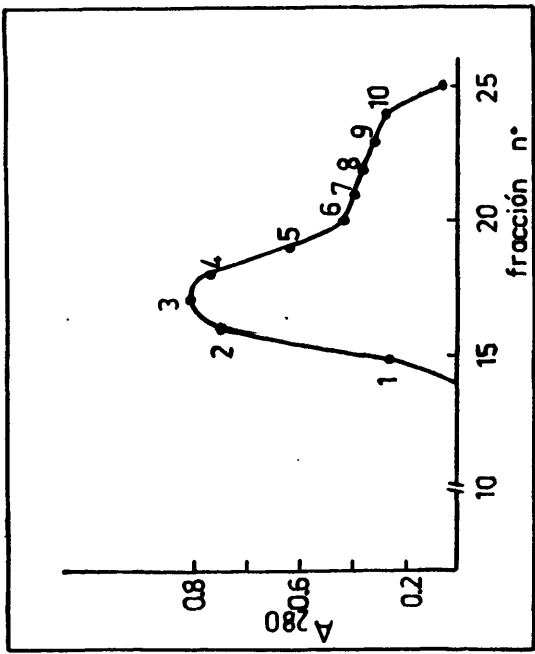
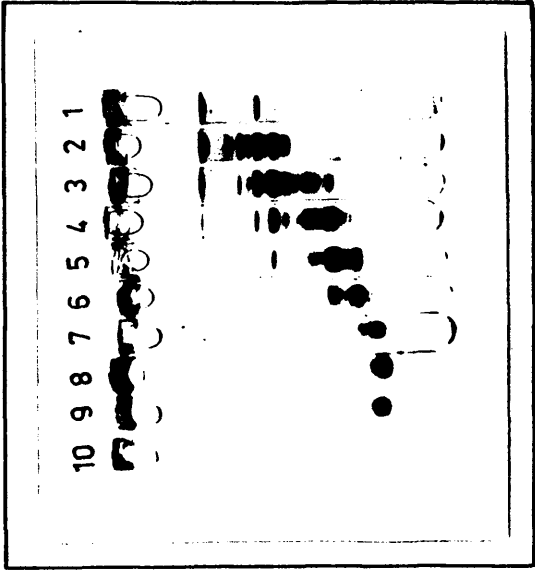
#### I. Sephadex G-200, combinado con Sepharosa 4B

Se siembran entre 18-20 mg de proteína de solubilizado de sedimentos de sonicación, en una columna de Sephadex G-200 (1,5x60 cm), equilibrada con tampón fosfatos 0,1M pH 7,2, azida sódica 0,02%, SDS 0,1%. Se recogen fracciones de 3 ml y se mide su  $DO_{280}$ , obteniendo un perfil de elución que puede verse en la Figura 12. Estas fracciones se analizan por SDS-PAGE (Lámina V),



LAMINA IV

Microfotografías electrónicas de sedimentos  
de sonicación.  
A (x80.000); B (x100.000).



LAMINA V  
Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (sin reducir) de la cromatografía representada en la Figura 12. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

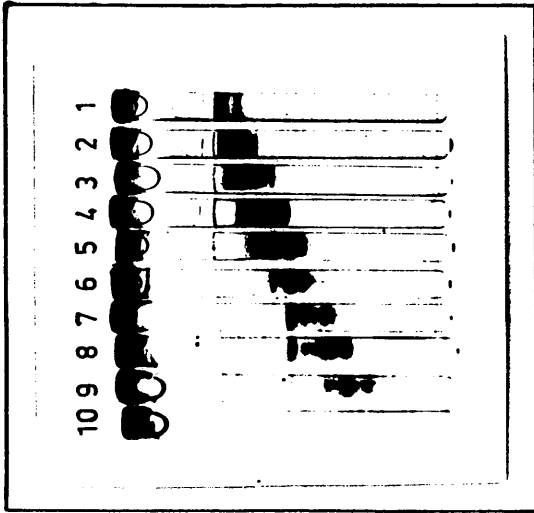
FIGURA 12  
Perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-200 (1,5x60 cm).

observándose que existe una buena separación de los componentes de bajo peso molecular; por el contrario, los componentes de glicoproteínas aparecen muy mal separados. A la vista de ésto, las fracciones correspondientes a los geles 2, 3 y 4 de varios fraccionamientos sobre Sephadex G-200 se concentraron a aproximadamente 2 ml y se recromatografiaron sobre Sepharosa 4B (1,5x60 cm). El perfil de elución de este fraccionamiento puede verse en la Figura 13 y un análisis electroforético de las distintas fracciones en la Lámina VI. Se observa que este gel separa mucho mejor las diferentes glicoproteínas, apreciándose un enriquecimiento considerable de GP III en las fracciones correspondientes a los geles 6, 7 y 8.

## II. Sepharosa 4B combinada con Sephadex 150

A la vista de los resultados favorables obtenidos con el uso de Sepharosa 4B, se decidió comenzar el fraccionamiento de los sedimentos de sonicación solubilizados, sobre este gel. La columna era de (1,5x60)cm y el perfil de elución y el análisis electroforético de las distintas fracciones se muestran en la Figura 14 y Lámina VII, respectivamente.

Como era de esperar, se obtiene una relativamente buena separación de GP III de otras proteínas de más alto peso molecular; sin embargo, las fracciones ricas en GP III muestran bastante contaminación de peso molecular más bajo. Estas fracciones se concentraron a 1,5 ml y se recromatografiaron sobre una columna de Sephadex G-150 (1x100 cm), cuyo perfil de elución y el análisis electroforético de las diferentes fracciones puede verse en



LAMINA VI

Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (sin reducir) de la cromatografía representada en la Figura 13. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

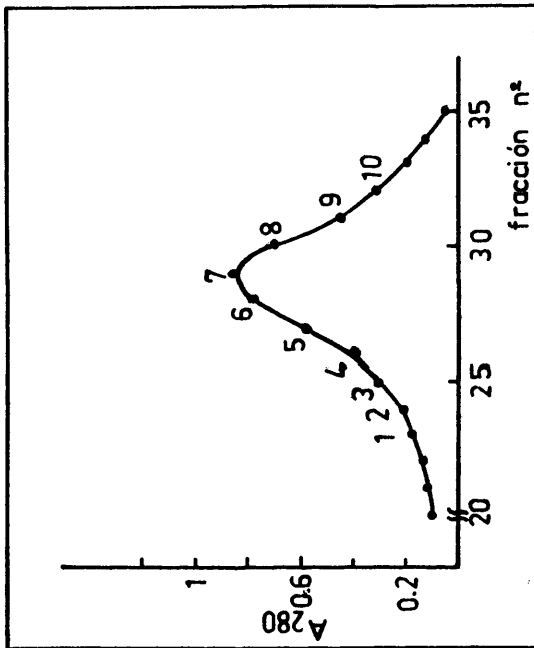


FIGURA 13

Perfil de elución de la cromatografía en Sepharosa 4B (1,5x60 cm).

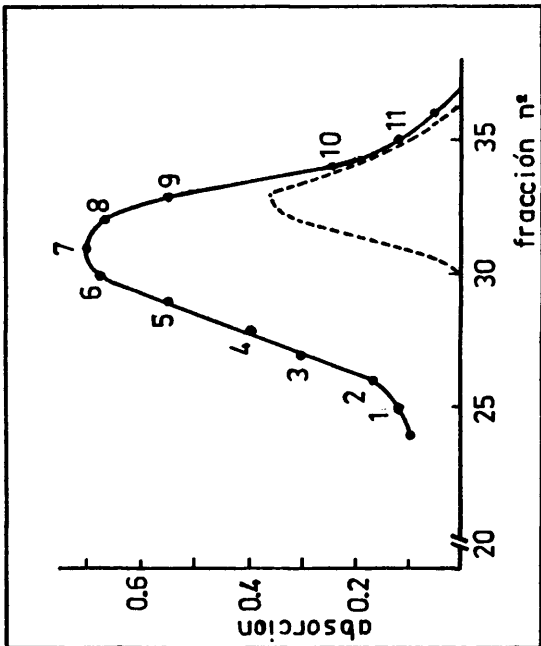
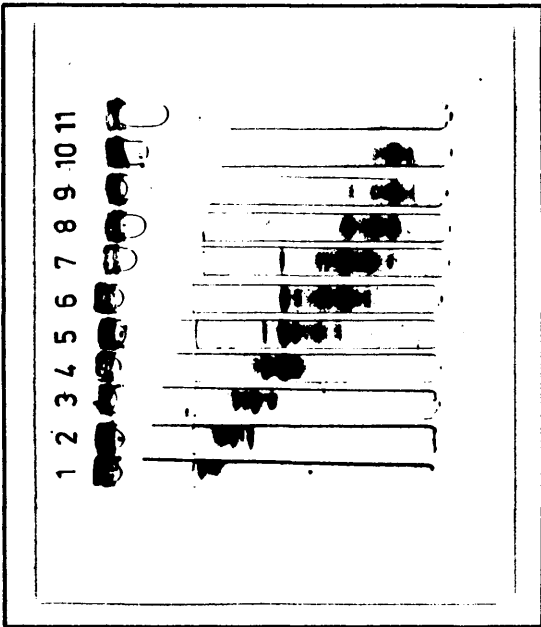


FIGURA 14

Perfil de elución de la cromatografía en Sepharosa 4B (1,5x60 cm).

- absorción a 280 nm
- absorción a 340 nm

LAMINA VII

Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (sin reducir) de la cromatografía representada en la Figura 14. Electroforesis en tampón fosfato. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

la Figura 15 y Lámina VIII respectivamente, obteniendo resultados satisfactorios, pues las fracciones correspondientes a los geles 2, 3 y 4 están ya bastante enriquecidos en GP III.

Con la intención de conocer la zona donde salen los lípidos en la columna de Sepharosa 4B, se sembraron en ésta 10 mg de lípidos de eritrocitos (aislados por nosotros según (5)), disueltos en SDS, que llevaban incorporados 100 µg de pireno para su posterior detección, que se realizó midiendo la  $DO_{340}$  (Figura 14). Se observa que los lípidos se eluyen en la zona final del cromatograma con las fracciones de baja masa molecular, por tanto las fracciones ricas en GP III que posteriormente se purificarán, casi no deben de llevar lípidos.

Al tiempo que se realizaban estos estudios de cromatografía de exclusión ya comenzaban a purificarse por cromatografía de afinidad las fracciones más enriquecidas en GP IIIa. Se pensó entonces en emplear tampones de elución comunes para cromatografía de afinidad y de exclusión, por lo que en lo sucesivo se utilizó en ambos casos un tampón de ClNa 0,25M, fosfatos 0,02M pH 7,2, conteniendo azida sódica al 0,02%, y se bajó la cantidad de SDS al 0,05%.

Por otra parte, también se observó que las contaminaciones que más influían en la eficiencia de la purificación de la GP IIIa por cromatografía de afinidad eran las de alto peso molecular. A la vista de esto, se decidió finalmente realizar la combinación de fraccionamientos por tamaño, que se describe a continuación.

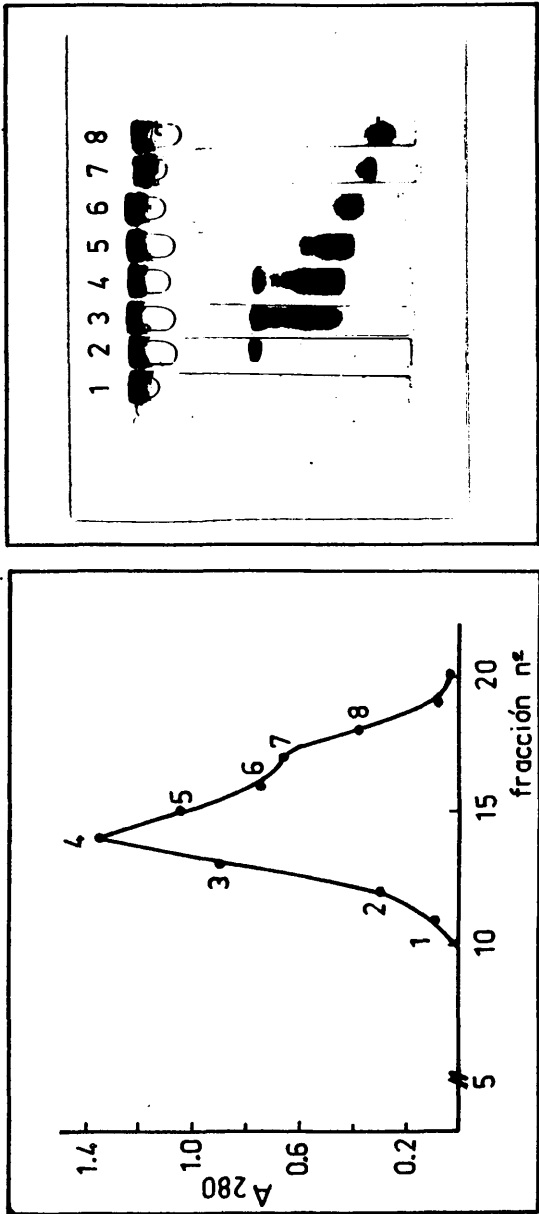
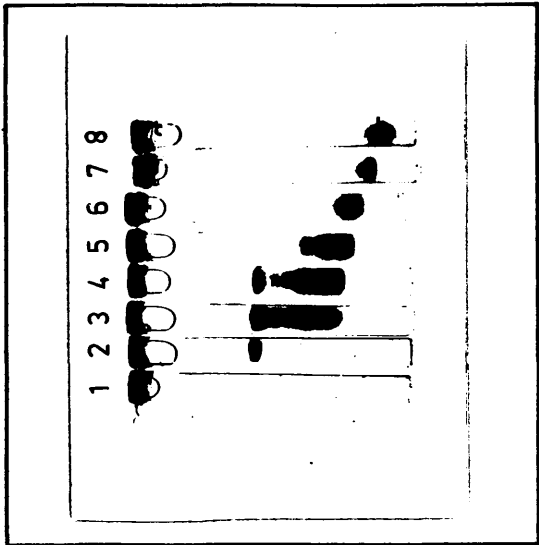


FIGURA 15

Perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-150 (1x100 cm).



LAMINA VIII

Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (sin reducir) de la cromatografía representada en la Figura 15. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

III. Sepharosa 4B combinada con Sepharosa 6B  
o Sephacryl 300

Primeramente, un fraccionamiento sobre Sepharosa 4B incrementando el tamaño de la columna a (2,5x100 cm), y la cantidad de muestra a 80 mg de proteína de sedimentos solubilizados.

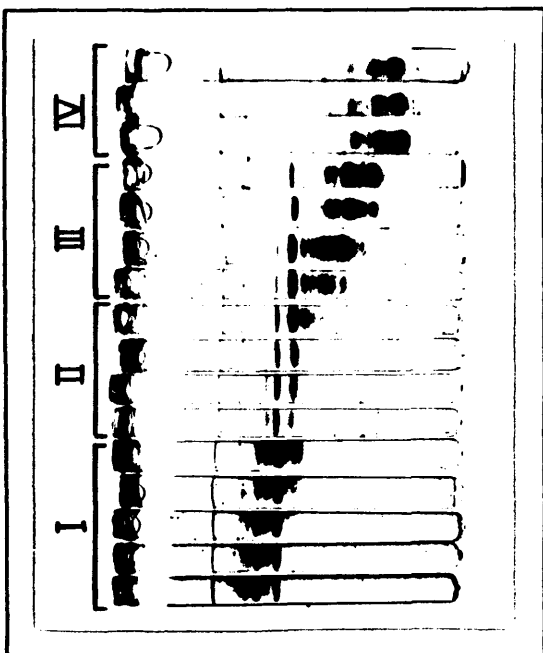
El perfil de elución a 280 nm y el análisis de las diferentes fracciones por SDS-PAGE aparece en la Figura 16 y Lámina IX, respectivamente. Como puede verse en la Figura, con las diferentes fracciones pueden hacerse cuatro grupos bien diferenciados.

Las fracciones del grupo II, ricas en GP III pero con gran cantidad de GP II, se concentran y se vuelven a cromatografiar sobre Sepharosa 6B o sobre Sephacryl 300, siendo los resultados similares en ambas cromatografías; se utilizó con más frecuencia Sephacryl 300 debido a los flujos más altos que se alcanzaban con este gel.

Las fracciones de esta última cromatografía libres de GP II y las del grupo III del fraccionamiento sobre Sepharosa 4B (Figura 16) son las que se someten a ulterior purificación por cromatografía de afinidad.

III.3.2. Cromatografía de afinidad

Inicialmente, la concentración de detergente en el tampón de elución en estas cromatografías fue del 0,1%. Habiendo necesidad de lavar intensamente la columna por desprenderse gran cantidad de Con A, se pensó en reducir la concentración de deter



LAMINA IX

Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (sin reducir) de la cromatografía representada en la Figura 16. Electroforesis en tampón fosfatado. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

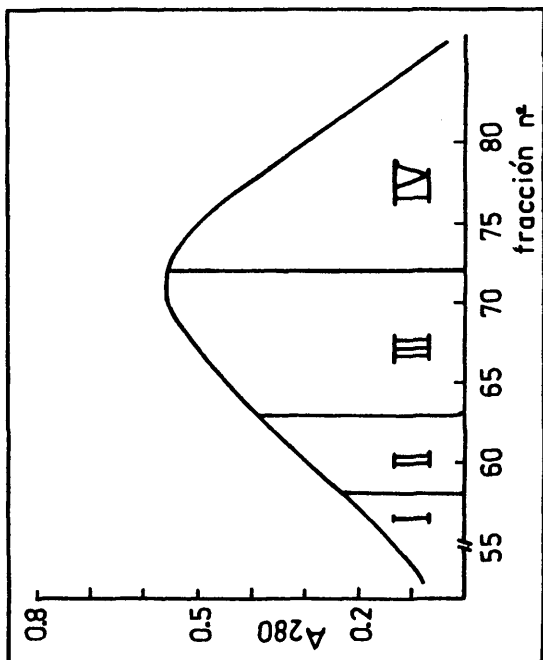


FIGURA 16

Perfiles de elución de la cromatografía en Sepharosa 4B (2,5x100 cm).

gente al 0,05%, concentración a la que las muestras todavía permanecían en solución, y se aumentaba la eficiencia y duración de las columnas de Con A-Sepharosa.

La Con A-Sepharosa que se utilizó en las primeras etapas era comercial, pero para evitar problemas de conservación y poder disponer de ella recién preparada en cualquier momento, se decidió prepararla en el laboratorio. Las variaciones del gel así obtenido respecto al de origen comercial son las siguientes: a) se activó Sepharosa 6B en vez de 4B, y b) se disminuyó en cinco veces la cantidad de Con A por ml de gel (10 mg/ml en la comercial, frente a 2 mg/ml en la nuestra). Preparado de este modo, el gel dió mejores resultados, observándose que la cantidad de Con A desprendida de la columna por lavado era menor, y que las columnas permanecían más tiempo útiles, pudiendo fraccionarse hasta cinco veces en la misma columna.

Por otro lado, se hicieron pruebas en cuanto a la cantidad máxima de material que podía sembrarse en la columna compatible con una eficiencia satisfactoria (grado de retención de GP IIIa y grado de pureza de GP IIIa una vez eluida), observándose que dependía del grado de purificación de la muestra sembrada, cuanto menos purificada estaba, menos material podía sembrarse, ya que de otro modo aparecían impurezas en la fracción de GP IIIa.

No se observaron diferencias en la capacidad de retención al detener la elución de la columna una vez sembrada la muestra, comparado con la elución sin interrupción, es decir, siembra seguida inmediatamente de elución.

La Figura 17 muestra el grado de enriquecimiento en GP IIIa de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión que se emplearon para cromatografía de afinidad en Con A-Sepharosa.

Un perfil de elución típico puede verse en la Figura 18. En algunas ocasiones se utilizó para la elución de la proteína retenida  $\alpha$ -MDG en vez de  $\alpha$ -MDM, obteniendo resultados similares.

Bajo estas condiciones, los rendimientos son los siguientes: se obtienen 2 mg de proteína de GP IIIa de cada 100 mg de proteína de MPPH (según Lowry), que a su vez proceden de 75 unidades de plaquetas.

#### III.4. CARACTERIZACION DE LA GP IIIa

##### III.4.1. Criterio de pureza y peso molecular aparente de la GP IIIa por SDS-PAGE

La GP IIIa aislada a partir de MPPH, fué estudiada por SDS-PAGE utilizando dos sistemas con tampones y concentración en acrilamida diferentes.

##### III.4.1.1. SDS-PAGE en tampón fosfatos y 5% de acrilamida

En estas condiciones la GP IIIa presenta una única banda tiñendo tanto para proteínas totales como para glicoproteínas , como puede verse en la Figura 19.

Se observa también que la movilidad electroforética de esta proteína no varía cuando se reduce con 2-ME al 2% durante

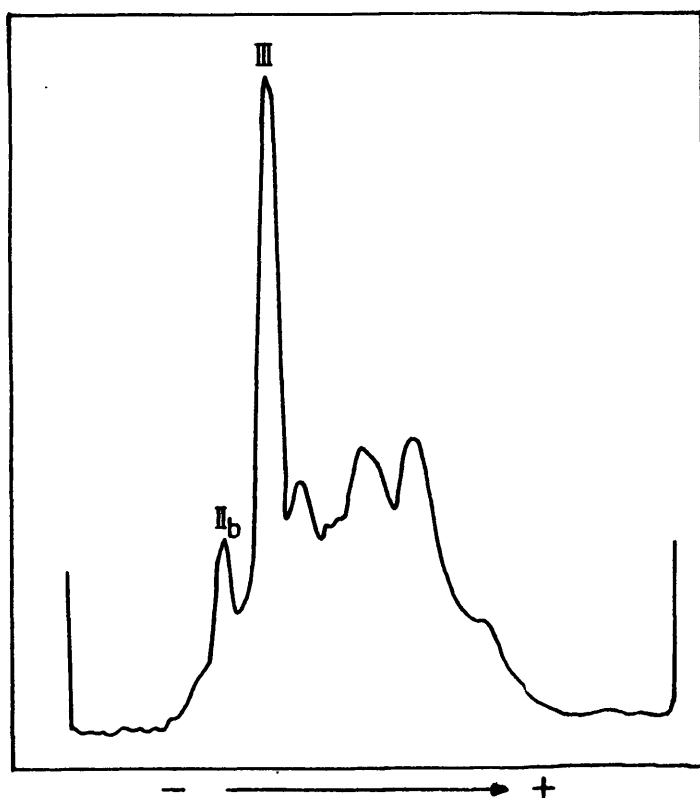


FIGURA 17

Perfil electroforético de una fracción enriquecida en GPIII (reducida), que será utilizada en cromatografía de afinidad. Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 8%. Tinción para proteínas totales

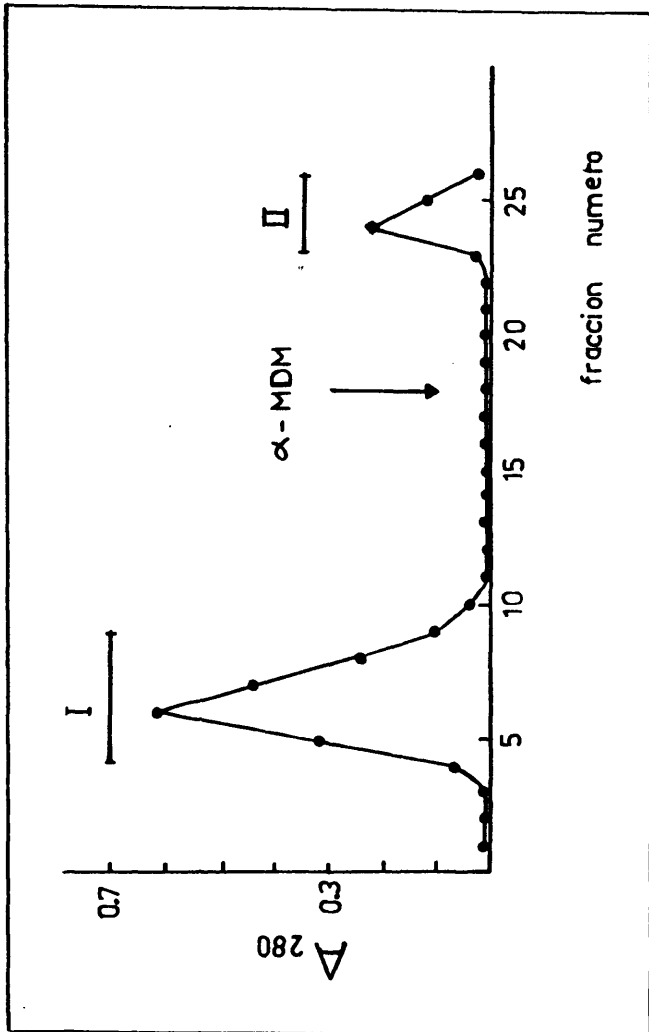
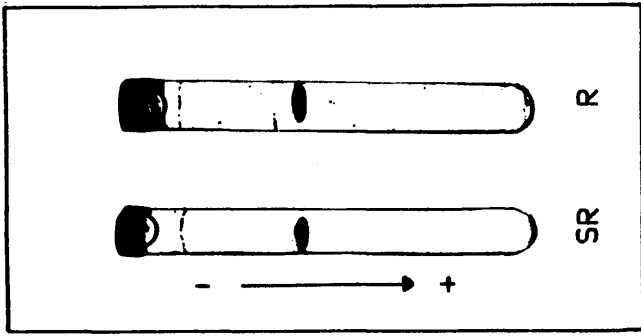


FIGURA 18

Perfil de elución de la cromatografía en Con A-Sepharosa 6B (1,5x40 cm).  
I, fracción no retenida; II, fracción retenida y eluida con 5%  $\alpha$ -MDM.



LAMINA X

SDS-PAGE de GPIIa. SR, sin reducir. R, reducida. Electroforesis en tampón fosfatado. Geles del 5%. Tinción para proteínas totales.

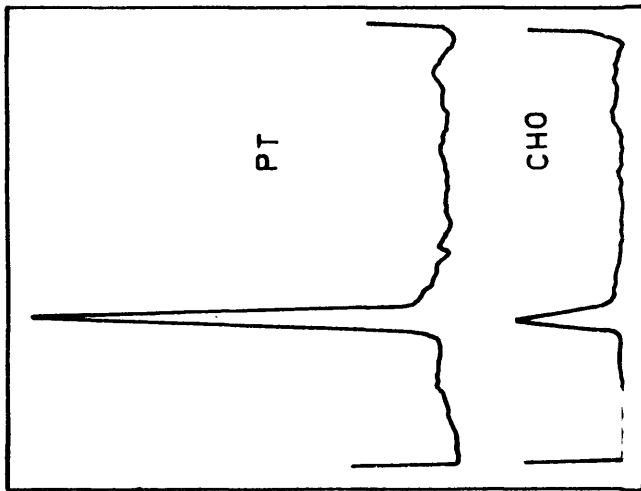


FIGURA 19

Perfiles electroforéticos de GPIIa sin reducir. Electroforesis en tampón fosfatado. Geles del 5%. PT, tinción para proteínas totales. CHO, tinción para glicoproteínas.

3 minutos a 100°C (Lámina X).

En la Figura 20 puede verse una curva de calibración de movilidad relativa de proteínas estandar frente al logaritmo de sus pesos moleculares. A partir de esta curva se determinó un peso molecular aparente para la GP IIIa de 95.000.

#### III.4.1.2. SDS-PAGE en tampón Tris-glicina y 7% de acrilamida

También en estas condiciones la GP IIIa presenta una banda única tiñendo tanto para proteínas totales como para glicoproteínas.

Mediante este sistema de electroforesis se observa que la GP IIIa al ser reducida en condiciones iguales a las anteriores, disminuye su movilidad electroforética, como puede verse en la Lámina XI.

Según la curva de calibración mostrada en la Figura 21, se determina un peso molecular para la GP IIIa sin reducir de 95.000 y de 110.000 para la especie reducida.

#### III.4.2. Composición química

La GP IIIa previamente dializada frente a agua, se analizó para determinar su contenido en aminoácidos, azúcares y fósforo. También se determinó la cantidad de SDS que aún permanecía ligado a la glicoproteína después de 3 semanas de diálisis.

Los resultados de estos análisis pueden verse en la Tabla III.

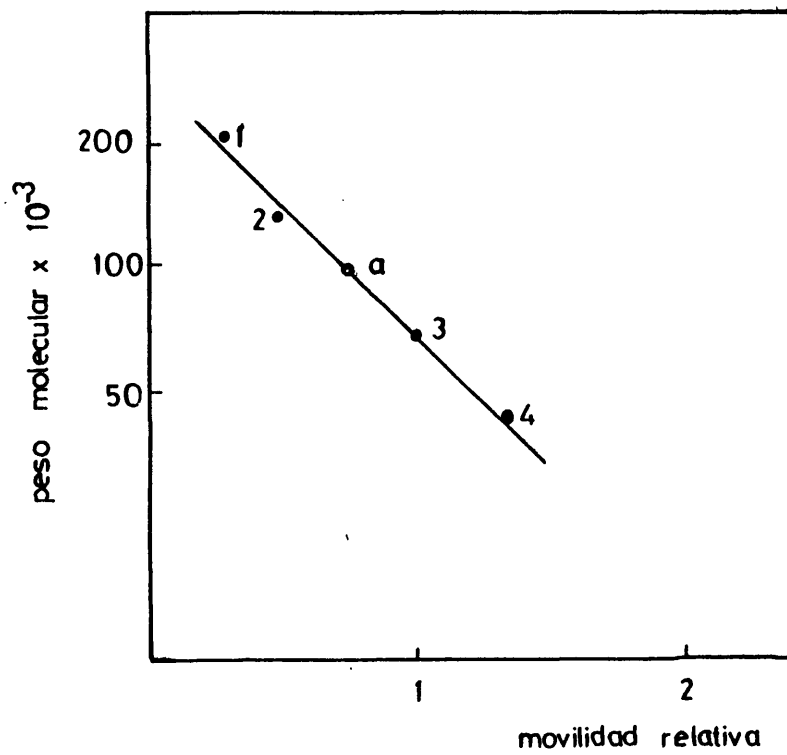
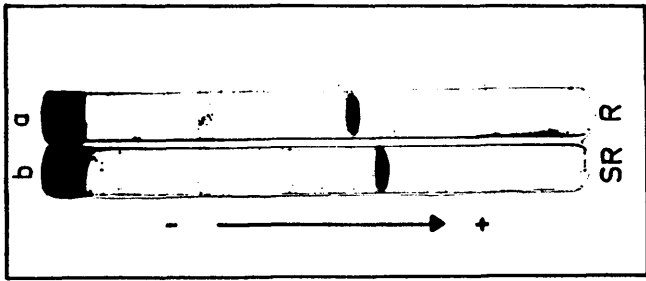


FIGURA 20

Representación gráfica del logaritmo de los pesos moleculares de proteínas estandar, frente a su movilidad relativa en SDS-PAGE, en un medio de tampón fosfatos y geles del 5%. 1, BSA, trímero; 2, BSA, dímero; 3, BSA, monómero; 4, ovoalbúmina; a, GPIIIa.



LAMINA XI

SDS-PAGE de GPIIIa. SR, sin reducir; R, reducida. Electroforesis en tampón Tris-glicina. Geles del 7%. Tinción para proteínas totales.

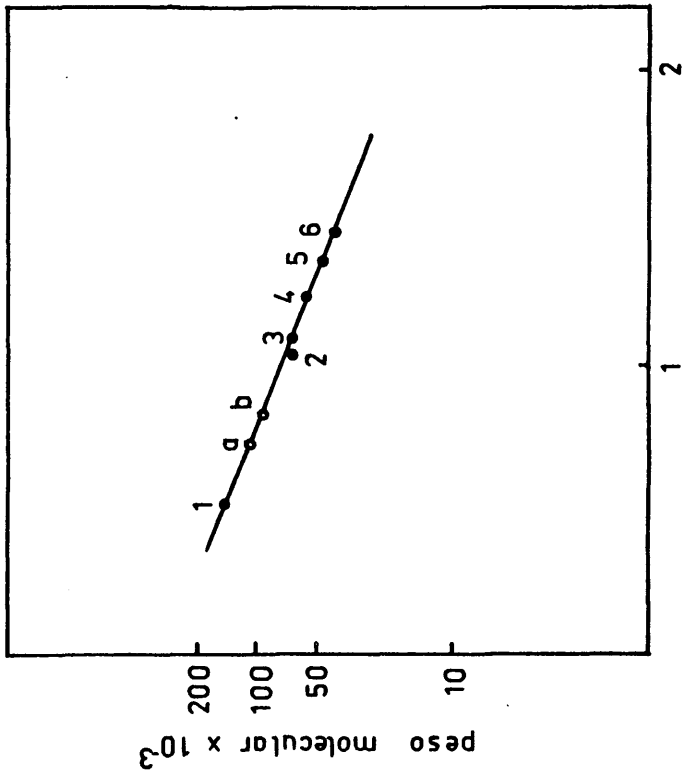


FIGURA 21

Representación gráfica del logaritmo de los pesos moleculares de proteínas estándar, frente a su movilidad relativa en SDS-PAGE en un medio de tampón Tris-glicina y geles del 7%. 1, BSA dímero; 3, BSA monómero; 2, 4 y 5 cadenas A<sub>0</sub>, B<sub>8</sub> y γ (respectivamente) procedentes de la reducción del fibrinógeno humano; 6, ovoalbúmina. a, GPIIIa R; b, GPIIIa SR.

TABLA III

COMPOSICION DE AMINOACIDOS Y AZUCARES DE LA GP IIIa

| <u>Composición de aminoácidos</u> <sup>a</sup> |                                   |              | <u>Composición de azúcares</u> |                                   |
|--|-----------------------------------|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Aminoácido                                     | <u>residuo</u><br>res. triptófano | %<br>residuo | Azucar                         | <u>residuo</u><br>res. triptófano |
| Ac. Aspártico                                  | 14,7                              | 10,5         | Manosa <sup>c</sup>            | 10,6                              |
| Treonina                                       | 7,4                               | 5,3          | Galactosa <sup>c</sup>         | 6,1                               |
| Serina   | 10,8                              | 7,7          | Glucosa <sup>c</sup>           | 12,2                              |
| Ac. Glutámico                                  | 13,2                              | 9,4          | Hexosaminas                    | 4,6                               |
| Prolina  | 5,5                               | 3,9          | NANA                           | n.d.                              |
| Glicina  | 9,3                               | 6,6          |                                |                                   |
| Alanina  | 7                                 | 5            |                                |                                   |
| Cisteína                                       | 7,7                               | 5,5          |                                |                                   |
| Valina   | 7                                 | 5            |                                |                                   |
| Metionina                                      | 2,3                               | 4,4          |                                |                                   |
| Leucina  | 10,7                              | 7,7          |                                |                                   |
| Tirosina                                       | 3,7                               | 2,7          |                                |                                   |
| Triptófano <sup>b</sup>                        | 1                                 | 0,7          |                                |                                   |
| Fenilalanina                                   | 4,1                               | 2,9          |                                |                                   |
| Histidina                                      | 1,5                               | 1,1          |                                |                                   |
| Lisina   | 7,6                               | 5,5          |                                |                                   |
| Amoniaco                                       | 14,7                              | 10,5         |                                |                                   |
| Arginina                                       | 5,2                               | 3,7          |                                |                                   |

a - Valores promedio de 5 análisis de dos preparaciones diferentes de GP IIIa.

b - Determinación espectrofotométrica.

c - Valores promedio de 6 análisis de 3 preparaciones diferentes de GP IIIa.

nd - No detectado.

#### III.4.2.1. Composición de aminoácidos

Como puede verse en la Tabla III, en este glicoproteína es de destacar el predominio de residuos ácidos (20%) frente al de básicos y el alto contenido en cisteína (5,5%). También se observa que se trata de una proteína de alta polaridad.

Se determinó un coeficiente de corrección para transformar las concentraciones de proteína de glicoproteína, determinadas mediante el método de Lowry, en concentraciones según análisis de aminoácidos. Este coeficiente de corrección resultó ser 1,11.

#### III.4.2.2. Composición de azúcares

Por cromatografía gaseosa se determinó el contenido en hexosas individuales de la GP IIIa. El contenido de cada azúcar por  $\mu\text{g}$  de proteína (según Lowry) fué de: manosa 0,14  $\mu\text{g}$ , galactosa 0,08  $\mu\text{g}$  y glucosa 0,16  $\mu\text{g}$ .

El contenido en hexosaminas se determinó colorimétricamente y fué de 0,06  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  proteína (Lowry).

No se detectó la presencia de ácido siálico.

A la vista de estos resultados se obtiene una relación entre los diferentes azúcares de: Man:Gal:Glc:Hexosaminas:NANA 2,3:1,3:2,7:1:0.

#### III.4.2.3. Contenido en fósforo y SDS ligado

No se detectó la presencia de fósforo y la cantidad de SDS que permanecía ligado a la proteína fué de 0,02-0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$

**TABLA III**

COMPOSICION DE AMINOACIDOS Y AZUCARES DE LA GP IIIa

| <u>Composición de aminoácidos <sup>a</sup></u> |                                   |              | <u>Composición de azúcares</u> |                                   |
|--|-----------------------------------|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Aminoácido                                     | <u>residuo</u><br>res. triptófano | %<br>residuo | Azucar                         | <u>residuo</u><br>res. triptófano |
| Ac. Aspártico                                  | 14,7                              | 10,5         | Manosa <sup>C</sup>            | 10,6                              |
| Treonina                                       | 7,4                               | 5,3          | Galactosa <sup>C</sup>         | 6,1                               |
| Serina   | 10,8                              | 7,7          | Glucosa <sup>C</sup>           | 12,2                              |
| Ac. Glutámico                                  | 13,2                              | 9,4          | Hexosaminas                    | 4,6                               |
| Prolina  | 5,5                               | 3,9          | NANA                           | n.d.                              |
| Glicina  | 9,3                               | 6,6          |                                |                                   |
| Alanina  | 7                                 | 5            |                                |                                   |
| Cisteína                                       | 7,7                               | 5,5          |                                |                                   |
| Valina   | 7                                 | 5            |                                |                                   |
| Metionina                                      | 2,3                               | 4,4          |                                |                                   |
| Leucina  | 10,7                              | 7,7          |                                |                                   |
| Tirosina                                       | 3,7                               | 2,7          |                                |                                   |
| Triptófano <sup>b</sup>                        | 1                                 | 0,7          |                                |                                   |
| Fenilalanina                                   | 4,1                               | 2,9          |                                |                                   |
| Histidina                                      | 1,5                               | 1,1          |                                |                                   |
| Lisina   | 7,6                               | 5,5          |                                |                                   |
| Amoniaco                                       | 14,7                              | 10,5         |                                |                                   |
| Arginina                                       | 5,2                               | 3,7          |                                |                                   |

a - Valores promedio de 5 análisis de dos preparaciones diferentes de GP IIIa.

b - Determinación espectrofotométrica.

c - Valores promedio de 6 análisis de 3 preparaciones diferentes de GP IIIa.

nd - No detectado.

#### III.4.2.1. Composición de aminoácidos

Como puede verse en la Tabla III, en este glicoproteína es de destacar el predominio de residuos ácidos (20%) frente al de básicos y el alto contenido en cisteína (5,5%). También se observa que se trata de una proteína de alta polaridad.

Se determinó un coeficiente de corrección para transformar las concentraciones de proteína de glicoproteína, determinadas mediante el método de Lowry, en concentraciones según análisis de aminoácidos. Este coeficiente de corrección resultó ser 1,11.

#### III.4.2.2. Composición de azúcares

Por cromatografía gaseosa se determinó el contenido en hexosas individuales de la GP IIIa. El contenido de cada azúcar por  $\mu\text{g}$  de proteína (según Lowry) fué de: manosa 0,14  $\mu\text{g}$ , galactosa 0,08  $\mu\text{g}$  y glucosa 0,16  $\mu\text{g}$ .

El contenido en hexosaminas se determinó colorimétricamente y fué de 0,06  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  proteína (Lowry).

No se detectó la presencia de ácido siálico.

A la vista de estos resultados se obtiene una relación entre los diferentes azúcares de: Man:Gal:Glc:Hexosaminas:NANA 2,3:1,3:2,7:1:0.

#### III.4.2.3. Contenido en fósforo y SDS ligado

No se detectó la presencia de fósforo y la cantidad de SDS que permanecía ligado a la proteína fué de 0,02-0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$

proteína (Lowry).

#### III.4.2.4. Composición centesimal

A la vista de los resultados mencionados anteriormente obtenemos una composición centesimal de la GP IIIa de 72% de proteína, 24,5% de hexosas y 3,5% de hexosaminas.

#### III.4.3. Volumen específico parcial de la GP IIIa

Según la composición de aminoácidos de la GP IIIa y aplicando la fórmula vista en II.6.5., se obtiene un  $V_p$  para la parte proteica de  $0,722 \text{ ml.g}^{-1}$ , y considerando la composición centesimal de la GP IIIa de 72% proteína, 24,5% hexosas y 3,5% hexosaminas, obtenemos un  $V_p$  para la glicoproteína de  $0,693 \text{ ml.g}^{-1}$ .

#### III.4.4. Identificación de la glicoproteína aislada como la GP IIIa de MPPH

Comparando la movilidad electroforética de la glicoproteína aislada, tanto reducida como sin reducir, con la de las proteínas de la membrana completa en iguales condiciones, se identifica a esta glicoproteína con la GP IIIa.

Esta GP IIIa migra, en condiciones de no reducción, en la posición de la glicoproteína de mayor movilidad electroforética y bajo ciertas condiciones (tampón Tris-glicina, acrilamida al 7%), se observa que se tiñe muy intensamente tanto para proteínas totales, como para glicoproteínas, al contrario de la glicoproteína denominada GP IIb que casi no se tiñe para proteínas totales.

Todo ésto se ve muy bien reflejado en la Figura 22 y Lámina XII.

Esta GP IIIa también se relaciona a la fracción de GP III ausente en pacientes con trombostenia de Glanzmann (6).

III.4.5. Espectrofotometría de absorción y emisión de cromóforos intrínsecos. Determinación del coeficiente de extinción aparente a 280 nm en SDS al 0,1%

Aunque al dializar exhaustivamente frente a agua muestras de GP IIIa en SDS la glicoproteína se encuentra aparentemente en solución, la luz dispersa es tan grande que apenas es observable un máximo a 280 nm.

En la Figura 23 se recoge el espectro de absorción de la GP IIIa en SDS al 0,1%. Se observa un máximo a 280 nm típico de proteínas.

En la Figura 24 puede verse una recta de calibrado de absorción a 280 nm, de soluciones de GP IIIa en SDS al 0,1%, frente a su concentración en proteína medida por el método de Lowry. A partir de esta recta puede determinarse un  $\epsilon_{280} = 16,1 \text{ dl.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Si el contenido en proteínas por el método de Lowry lo transformamos en contenido en proteínas según análisis de aminoácidos, obtenemos un  $\epsilon_{280} = 14,4 \text{ dl.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

En la Figura 25 se recoge el espectro de emisión de fluorescencia de la GP IIIa para una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se aprecia un máximo a 340 nm típico de proteínas que contienen triptófano. También en la Figura 25 se muestra el espectro de excitación para una longitud de onda de emisión de



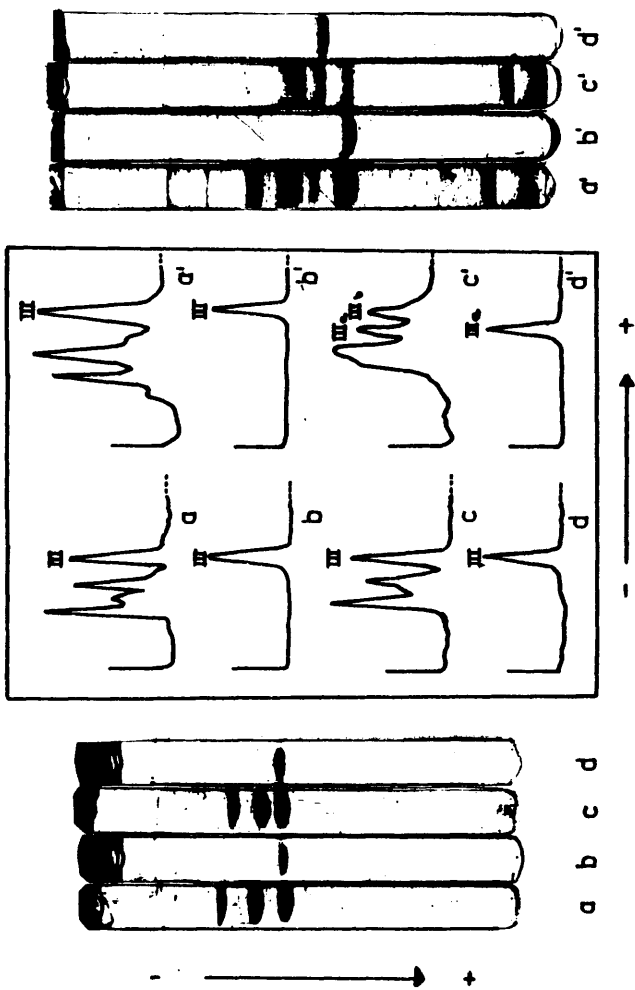
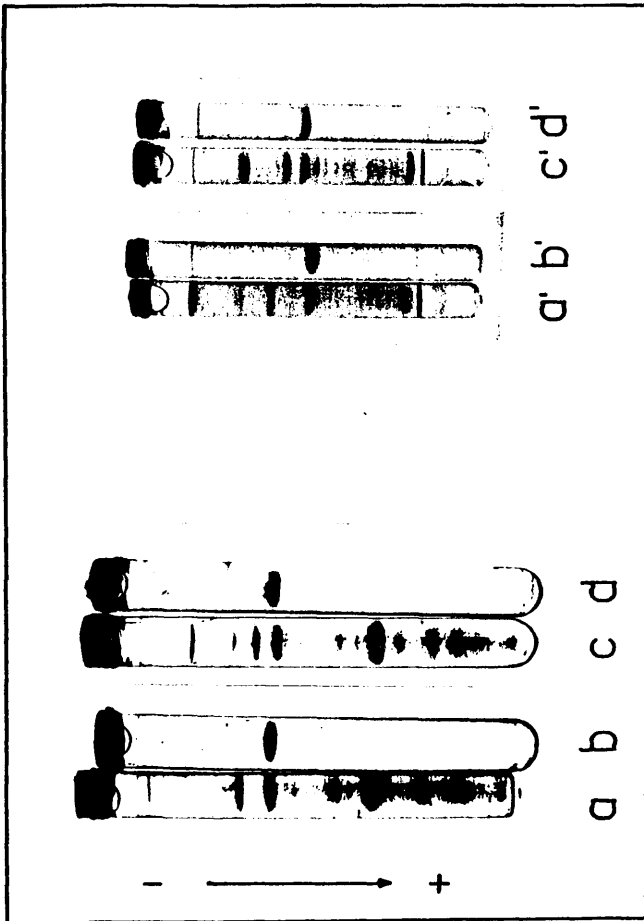


FIGURA 22

Geles y perfiles electroforéticos de las glicoproteínas de a, a', MPPH sin reducir; b, b' GPIIIa sin reducir; c, c' MPPH reducida; d, d' GPIIIa reducida. a, b, c y d. Electroforesis en tampón fosfatos y geles del 5%. a', b', c' y d'. Electroforesis en tampón Tris-glicina y geles del 7%.



LAMINA XII

SDS-PAGE de: a, a' MPPH sin reducir; b, b' GPIIa sin reducir; c, c' MPPH reducida; d, d' GPIIa reducida. a, b, c y d Electroforesis en tampón fosfatos. Geles del 5%; a', b', c' y d' electroforesis en tampón Tris-glicina. Geles del 7%. Tinción para proteínas totales.

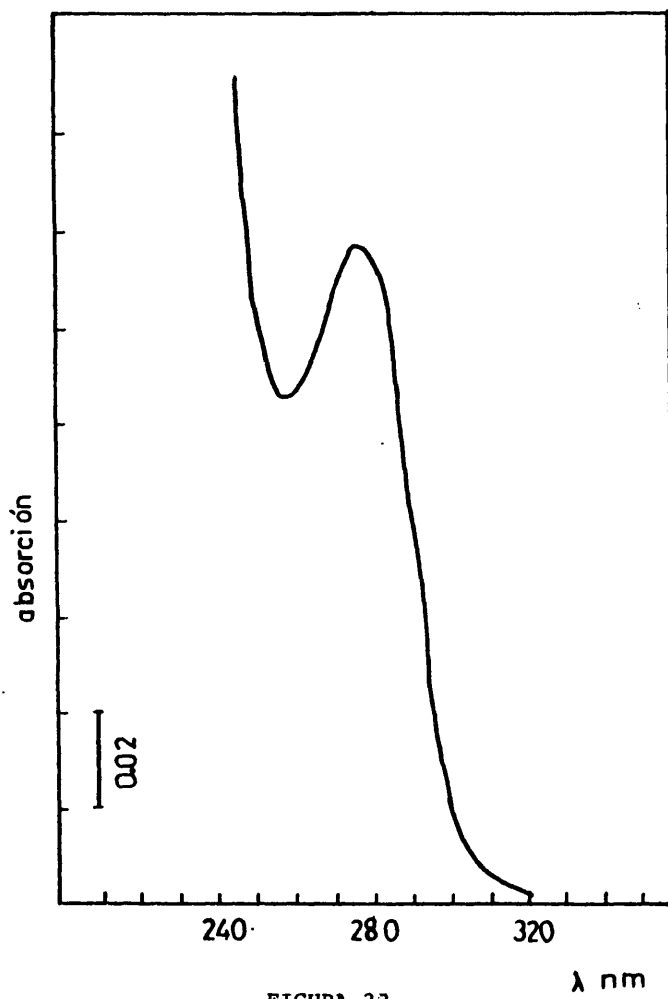


FIGURA 23

Espectro de absorción de GPIIIa en  
tampón fosfatos 10 mM. 0,1% SDS.

115

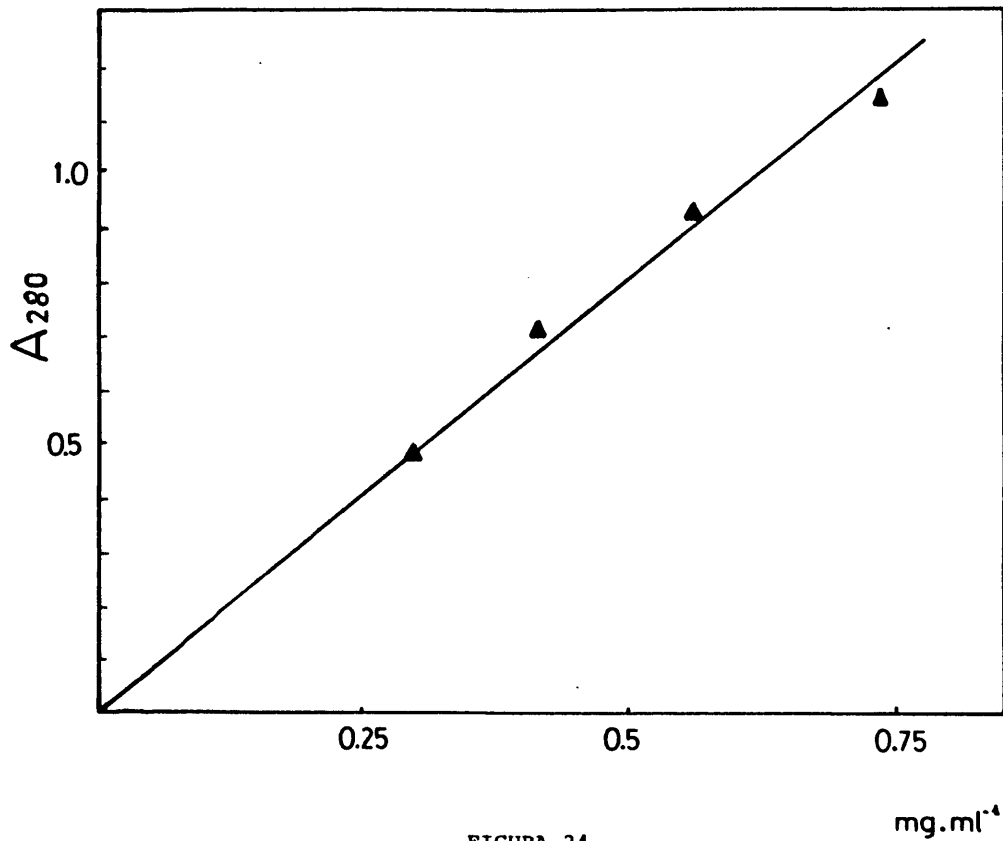


FIGURA 24

Absorción a 280 nm de GPIIIa en tampón fosfatos 10 mM  
0,1% SDS, frente a concentraciones en proteínas  
(Lowry).

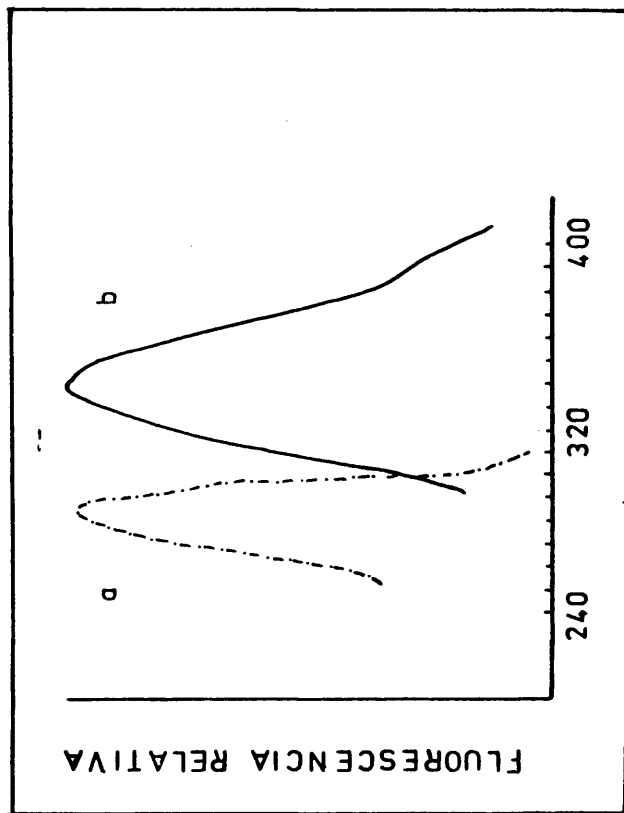


FIGURA 25

Espectros de fluorescencia de GP IIIa en tampón fosfatos  
10 mM, 0,1% SDS.

a, excitación  $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$

b, emisión  $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$

340 nm. Se observa un máximo típico también a 280 nm.

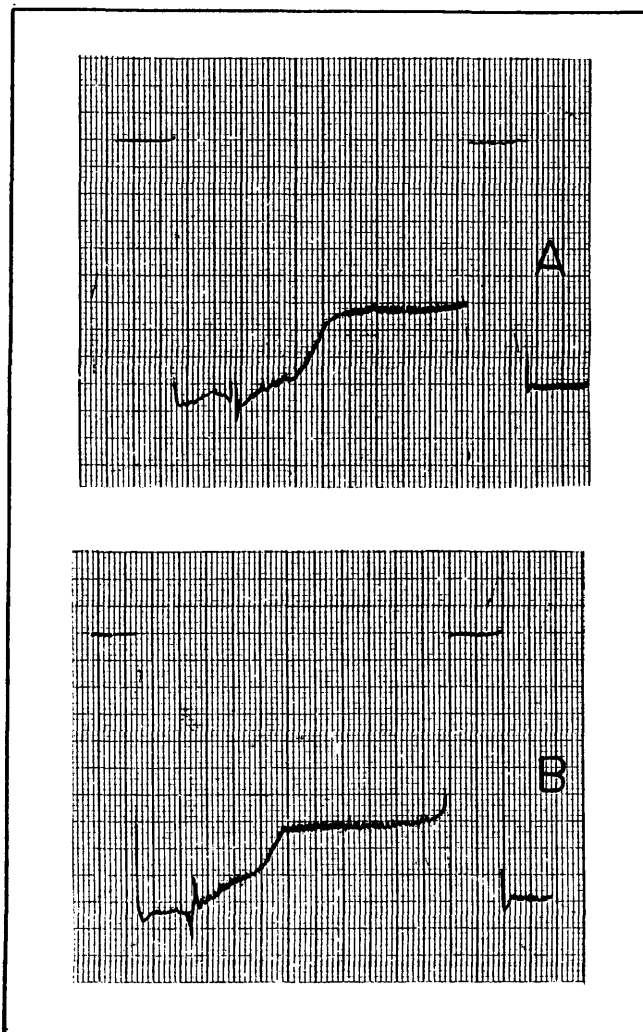
#### III.4.6. Estudios de ultracentrifugación analítica

Se han realizado experimentos de sedimentación de la glicoproteína aislada, a diferentes concentraciones del detergente SDS (0,05-1%), diferentes tampones, diferente estado de reducción de la muestra, y a concentraciones bajas de glicoproteína (entre 0,06 y 0,3 mg proteína (Lowry)/ml).

Los resultados obtenidos por velocidad de sedimentación no concuerdan con el comportamiento electroforético de la especie aislada. A pesar de las pequeñas variaciones entre los diferentes experimentos, dependientes de las variaciones de las condiciones experimentales, un comportamiento estandar y repetitivo es el de la existencia de más de una especie. Una que llamaremos especie rápida con un  $s_c = 4,1 S \pm 0,2$  y que representa el  $71\% \pm 4$  del total, y una especie(s) lenta(s) que a veces no llega a separarse del menisco y que tiene un  $s_c(\text{promedio}) = 1,6 S \pm 0,2$ .

Las pequeñas variaciones de los  $s_c$  mencionados anteriormente, al variar las condiciones de la muestra no son significativas.

Cabe destacar, sin embargo, el incremento aparente de la especie lenta al aumentar la cantidad de detergente. En la Figura 26 se muestran los perfiles de sedimentación de la misma GP IIIa dializada frente a SDS al 0,05 y 1%. Se observa que la proporción del componente lento incrementa de un 27% en SDS al 0,05% a un 36% en condiciones de SDS al 1%.



**FIGURA 26**

Perfiles de velocidad de sedimentación de la GP IIIa en A.- 0,05% de SDS, a los 41 min de sedimentación. B.- 1% de SDS, a los 38 min de sedimentación.

III.5. BIBLIOGRAFIA

- (1) BARBER, A.J., PEPPER, D.S. y JAMIESON, G.A. (1971)  
Thromb. Diathes. Hemorrh. 26, 38.
- (2) BARBER, A.J. y JAMIESON, G.A. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 6357.
- (3) TAYLOR, D.G. y CRAWFORD, N. (1974)  
FEBS Lett. 41, 317.
- (4) LAWLER, J.W., SLAYTER, H.S. y COLIGAN, J.E. (1978)  
J. Biol. Chem. 253, 8609.
- (5) KUIPER, P.J.C., LIVNE, A. y MEYERSTEIN, N. (1971)  
Biochim. Biophys. Acta 248, 300.
- (6) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1979)  
Seminars Hematol. 16, 234.

CAPITULO IV.- D I S C U S I O N

#### IV.1.- CARACTERISTICAS DEL SISTEMA MPPH UTILIZADO.

##### GLICOPROTEINAS

Aunque una preparación óptima de membranas plasmáticas debería contener toda la membrana plasmática de la célula en su estado original, es decir, sin que ésta hubiera sufrido cambios, y también sin contaminaciones con membranas de orgánulos celulares, en el caso de la plaqueta ésto es particularmente difícil, debido a sus propiedades únicas de proceder de la fragmentación del megacariocito y de poseer abundantes invaginaciones profundas, formando el sistema canalicular conectado a superficie.

En el curso de las investigaciones realizadas con este sistema se ensayaron diversos métodos de rotura celular (1, 2) como son: lisis osmótica simple, homogeneización mecánica, descompresión, etc. Ninguno de estos métodos resultó enteramente satisfactorio en cuanto a proporcionar poblaciones de membrana plasmática como envolturas celulares sencillas y continuas como es el caso de las membranas obtenidas de eritrocitos.

El método de aislamiento adoptado en este trabajo fué el basado en la capacidad de las plaquetas de acumular glicerol y luego ser lisadas en un medio hipotónico. Este método resultó satisfactorio en cuanto a facilidad, rendimiento y reproducibilidad.

Se ha comprobado que esta técnica de carga con glicerol

y lisis, es ventajosa por su alta eficiencia de rotura de plaquetas (entre un 80 y un 90%) y por el tamaño relativamente grande, entre 0,7 y 1,75  $\mu\text{m}$ , de las vesículas que forman los segmentos de fragmentación de membranas (2). Su desventaja está en que también se rompen elementos subcelulares, tales como gránulos, liberándose al soluble entre el 30 y el 40% de los enzimas lisosomales.

Otras técnicas tales como descompresión con nitrógeno y sonicación durante períodos de tiempo cortos, tienen la ventaja de causar menor destrucción de gránulos, sin embargo el tamaño de las vesículas que forman los fragmentos de membranas son muy pequeños, entre 0,03 y 0,3  $\mu\text{m}$  (2).

A la hora de evaluar el grado de pureza de la fracción aislada es indispensable el utilizar algún marcador. En las preparaciones de MPPH obtenidas por nosotros en el laboratorio, se han encontrado incrementos en actividad específica de fosfodiesterasa, respecto del lisado, de hasta cinco veces, y una actividad específica para membranas (aunque existían ligeras diferencias entre preparaciones) de 0,245  $\mu\text{moles/mg}$  proteína/h. Barber y Jamieson (3) observan enriquecimientos en esta actividad enzimática de hasta 8 veces, y Taylor y Crawford (4), trabajando con membranas de plaquetas de cerdo, también observan enriquecimientos considerables.

El número y clasificación de las glicoproteínas individuales de la membrana plaquetaria es todavía materia de investigación en varios laboratorios, y ninguna nomenclatura debe considerarse definitiva hasta que las diferentes especies de glicopro

teínas sean aisladas y caracterizadas.

En este trabajo se han utilizado dos condiciones de SDS-PAGE que han permitido identificar seis glicoproteínas denominadas GP Ia, GP Ib, GP IIa, GP IIb, GP IIIa y GP IIIb, interesándonos ahora relacionar estos datos con los resultados obtenidos por otros laboratorios, aunque las condiciones de trabajo sean diferentes entre unos y otros.

La existencia de las glicoproteínas GP Ia y GP Ib como dos glicoproteínas que migran juntas al ser reducidas (permaneciendo la GP Ib en el lugar original y la GP Ia aumentando su movilidad electroforética) también lo observan George (5) y Clemetson et al (6). Nurden y Caen (7) no mencionan este hecho, aunque en sus perfiles electroforéticos se observa con la reducción una variación de posición de la banda que denominan GP Ib, y también en estado de no reducción una pequeña banda entre su GP Ib y su GP IIb que correspondería a la GP Ib en la nomenclatura utilizada en esta memoria. Los resultados de Phillips y P. Agin (8), aunque citan la existencia de las glicoproteínas GP Ia y GP Ib, no concuerdan con los nuestros ni con los encontrados en (5, 6, 7), pues estos autores encuentran que la especie GP Ia incrementa su peso molecular con la reducción.

Que las especies GP IIa y GP IIb son la misma glicoproteína en estado diferente de reducción también se sugiere en (5, 6).

Clemetson et al (6) encuentran que en la zona de la GP IIa migra otra glicoproteína que no varía su posición con la reducción y que tiene afinidad por APA pero no por LCA, al contra-

rio que la GP IIa propiamente dicha que varía de posición con la reducción y que tiene gran afinidad por LCA.

Nosotros hemos encontrado en algunas ocasiones (Figura 8) que después de haber reducido la MPPH, permanece una pequeña banda en la posición de la GP IIa (sin reducir), no sabiendo si es debido a que la reducción no ha sido total o que en realidad se trate de esta fracción de GP II con afinidad por APA descrita en (6). Si esto último fuese lo correcto, en las ocasiones donde no se pone de manifiesto sería porque queda englobada en la banda de GP IIb.

Lo que no se detectó fue otra glicoproteína minoritaria denominada GP IIc por George (5) y que se caracteriza por migrar entre las glicoproteínas GP II y GP III y no variar de posición con la reducción. Esta glicoproteína tampoco fue vista por el resto de los autores.

Se coincide en aceptar que bajo ciertas condiciones las especies que forman la GP III se pueden poner de manifiesto, encontrándonos con las glicoproteínas GP IIIa y GP IIIb.

Los primeros en notar este hecho fueron Clemetsen et al (6), en su trabajo utilizando lectinas. Hoy también estos autores, junto con Nurden (7) y George (5), ven que la GP I<sub>1</sub> en condiciones de no reducción se tiñe intensamente para proteínas y carbohidratos. Bajo condiciones fuertemente reductoras utilizando un sistema de SDS-PAGE adecuado, se hacen visibles dos componentes: uno que se tiñe mucho para proteínas y azúcares y disminuye su movilidad electroforética y que denominaremos GP IIIa, y otro que no varía su posición, se tiñe mucho para carbohidra-

tos y apenas se tiñe para proteínas totales que denominaremos GP IIIb. Esta GP IIIb es seguramente la misma glicoproteína que Phillips y P. Agin (8) y Okumura y Jamieson (9) denominan GP IV.

Como puede observarse, los resultados se van unificando, sobre todo en cuanto a las glicoproteínas mayoritarias se refiere. Sería interesante, sin embargo, que en los diferentes laboratorios se adoptasen condiciones de trabajo similares para mayor facilidad a la hora de comparar resultados.

En lo que sí se observan diferencias es en la relación de intensidad de unas glicoproteínas respecto a otras.

En nuestras investigaciones observamos que la GP I muestra una intensidad menor respecto al resto de las glicoproteínas que la que presenta en los perfiles electroforéticos en (5, 9), y además que varía algo de unos fraccionamientos a otros. Esto podría ser debido a que casi siempre trabajamos con plaquetas de 3 a 7 días, ya que existen evidencias (10) de que la GP I desciende mucho en plaquetas almacenadas, al igual, aunque en mucho menor grado, que la GP III, no observándose diferencias en el contenido de GP II. Como en (10) se utilizan unas condiciones de electroforesis en las que no se separan la GP IIIa de la GP IIIb, no sabemos cómo estas dos especies descienden con el tiempo de almacenamiento.

#### IV.2. SOLUBILIZACION DE MPPH Y FRACCIONAMIENTO DE LOS COMPONENTES SOLUBILIZADOS. AISLAMIENTO DE LA GP IIIa

La primera etapa para la purificación de una proteína de membrana es su liberación de ésta en forma soluble.

El problema puede comenzar a resolverse utilizando técnicas empleadas en sistemas acuosos y que en nuestro caso serán útiles para la liberación de las proteínas periféricas. Hay evidencias de que pueden ser solubilizadas cantidades apreciables de proteínas de membrana utilizando condiciones que impliquen fuerza iónica alta (11) o baja (12), agentes quelantes (13), agua destilada (14), sonicación (15, 16, 17, 18), etc.

Así en el presente trabajo, irradiando con ultrasonidos durante períodos muy cortos de tiempo, pudo observarse la solubilización de un 27% del material proteico de la membrana, y además se observó mediante análisis electroforético del sobrenadante, la selectividad con la que la GP Ib se libera de la membrana, quedando el sedimento casi ausente de esta glicoproteína. Esta liberación tan fácil de la GP I, evidencia de nuevo su naturaleza de proteína extrínseca de MPPH, demostrada también por su susceptibilidad a proteasas (19).

El análisis electroforético de este sobrenadante de sonicación también reveló la liberación de gran cantidad de actina, aunque esta proteína seguía estando presente en la fracción sin solubilizar. Esto está muy de acuerdo con las observaciones de Podolsak (20), que sugiere que la actina está presente en dos formas de asociación con la membrana denominadas una "proteína asociada", la que se libera fácilmente, y otra "proteína integral", la que permanece, jugando esta última un papel como punto de anclaje para el sistema contráctil citoplasmático.

Ahora bien, este sobrenadante de sonicación no estaba constituido solamente de proteínas solubles, pues los análisis

de fósforo indican su presencia, lo que supone la existencia bien de fragmentos pequeños de membrana que no sedimentan, o complejos lipoproteicos, muy frecuentes por otra parte en la solubilización por ultrasonidos (21). Este sobrenadante de sonicación no fué utilizado en nuestros posteriores estudios, sino que se utilizó el sedimento, debido al gran enriquecimiento en el resto de las glicoproteínas.

Ahora bien, para solubilizar las proteínas restantes, muy ligadas a la matriz lipídica de la membrana (proteínas integrales), es necesario el uso de detergentes, sales biliares o solventes orgánicos.

Se sabe que los detergentes suaves pueden conducir a solubilizaciones específicas de componentes de membrana, debido a que solubilizan grandes conjuntos de proteínas de membrana que están unidas entre ellas por interacciones proteína-proteína. En nuestro caso solubilizando con 0,5% de DchNa, esto no surtió efecto pues como puede verse en la Figura 8 en el sobrenadante aparecen todos los componentes, aunque en diferentes proporciones a las que se encuentran en la membrana sin solubilizar.

Aunque solubilizando la membrana con sales biliares puede retenerse en ocasiones la actividad biológica, propiedad muy utilizada sobre todo en el campo de la mitocondria (21, 22), nosotros decidimos realizar todo el proceso de solubilización y fraccionamiento con el detergente SDS debido a su mayor poder de solubilización y a enfocar nuestro trabajo con la GP IIIa desde el punto de vista estructural. Como se ve en la Figura 9, con el SDS se llegan a solubilizar hasta un 95% de las proteínas de la mem-

brana para una relación proteína:detergente de 1:10.

Por todo lo anteriormente citado se comprende la ventaja de una primera sonicación para eliminar proteínas extrínsecas , seguida de solubilización del material residual con SDS.

En la presente investigación las proteínas de los sedimentos de sonicación de MPPH solubilizados, se han fraccionado por cromatografía de exclusión y no se han encontrado comportamientos anómalos de las proteínas a fraccionar, pues estas eluyen gradualmente conforme a sus pesos moleculares, como podía comprobarse posteriormente por SDS-PAGE.

Ahora bien, la cromatografía de exclusión tiene la ventaja de poder fraccionar grandes cantidades de proteína, pero tiene relativamente poca resolución a la hora de purificar un componente concreto, por lo que en un sistema tan complejo como el que manejamos es lógico suponer la imposibilidad de obtener un componente completamente purificado utilizando un método que sólo nos separe por tamaño, de ahí la necesidad de la utilización de técnicas complementarias.

En los últimos años el aislamiento de glicoproteínas ha sido facilitado considerablemente por el uso de cromatografía de afinidad utilizando lectinas (23, 24, 25, ...).

Ya Nachman et al (26) utilizando Con A-Sepharosa en medio acuoso, habían purificado parcialmente la glicoproteína de MPPH que más se marcaba con  $^{125}\text{I}$ , mediante iodación catalizada por lactoperoxidasa. Esta glicoproteína tenía un peso molecular aproximado de 100.000 y podría corresponderse con la GP III.

Nosotros hemos utilizado para la purificación de la GP IIIa,

Con A-Sepharosa en presencia de SDS. Aunque se sabe que el SDS daña a las lectinas disminuyendo su actividad (27, 28), nosotros observamos que la GP IIIa se une a la Con A con una gran afinidad aún en presencia de SDS a concentraciones tanto del 0,05 como del 0,1%.

También observamos que había que lavar abundantemente la columna previamente al paso de la muestra, pues sino aparecían contaminaciones de Con A con el material retenido. Esto es debido a que la mayoría de las lectinas, incluida la Con A, son proteínas formadas por subunidades unidas entre sí por uniones no covalentes, y que se disocian por efecto del SDS, permaneciendo unida a la columna solamente la subunidad acoplada directamente a la Sepharosa (29).

En alguna ocasión hemos encontrado, aunque el fenómeno no se cuantificó, bajas recuperaciones de GP IIIa al eluir con el azúcar, hecho que parece suceder con frecuencia en cromatografía de afinidad (30, 31), y aunque algunos autores lo relacionan a una pérdida de eficacia de las lectinas debido a su desnaturalización por el detergente (27, 28), se ha observado que en nuestro caso no se debe a esto pues analizando por SDS-PAGE la fracción no retenida, en ella no aparece la GP IIIa. Tampoco sería debido a una baja concentración de azúcar en la elución (5%  $\alpha$ -MDM ó 5%  $\alpha$ -MDG), pues se hicieron pruebas de posteriormente a haber eluido con 5%  $\alpha$ -MDM, eluir con otro tampón hasta cinco veces más concentrado en azúcar, no desprendiéndose más GP IIIa.

Pensamos por tanto que este fenómeno debe estar ocasionado por interacciones no específicas de la GP IIIa con la Con A ,

y que no pueden romperse por tratamiento con el azúcar adecuado (32). Hay datos de que la Con A acoplada a columnas de afinidad puede unir proteínas debido a interacciones de tipo hidrofóbico (33).

En cromatografía de afinidad, un punto a tener en cuenta es la cantidad de muestra que debe aplicarse a la columna. Adair y Kornfeld (34), sugieren que en columnas sobrecargadas las especies con alta afinidad se unen preferentemente a la lectina inmovilizada mientras que las de baja afinidad pasan a través de la columna. Nuestra experiencia demostró que para nuestro sistema esto no resultaba correcto pues observamos que al aplicar a la columna mucha cantidad de muestra la GP IIIa retenida aparecía con contaminaciones, y no precisamente de glicoproteínas. Si por el contrario se aplicaba menos material aparecía completamente purificada. También se observó que si el material compuesto por GP IIIa y contaminaciones polipeptídicas se dializaba para eliminar el azúcar y se volvía a cromatografiar sobre la misma columna, la GP III retenida aparecía completamente purificada, apareciendo en la fracción no retenida el material que ocasionaba la contaminación.

#### IV.3. COMPOSICION QUIMICA Y TAMAÑO DE LA GP IIIa

Como se observó en la Tabla III, las características más notables de la GP IIIa en cuanto a su composición en aminoácidos se refiere, es la de ser una proteína ácida (20% de residuos ácidos frente a un 10% de residuos básicos) y tener un alto contenido en cisteína y aminoácidos polares, no pudiendo, por

tanto, ser considerada esta glicoproteína como de baja polaridad (35).

Respecto al contenido en azúcares se observa un alto contenido en hexosas frente al de hexosaminas y la no detección de ácido siálico. Esta ausencia de ácido siálico en la zona de migración de esta glicoproteína (banda GP III), había sido puesta ya en evidencia previamente por métodos diferentes (19, 36) y explica la falta de afinidad de esta glicoproteína por WGA, lectina por la que tiene gran afinidad la GP I a la que se asocia la casi totalidad del ácido siálico presente en las glicoproteínas plaquetarias (19, 36).

El alto contenido de esta glicoproteína en manosa explica la gran afinidad que posee por la Con A, así como la afinidad por LCA, encontrada por Clemetson et al (6).

Lo que más destaca de su composición de azúcares es el contenido tan elevado en glucosa, pues hasta hace algunos años se dudaba de la presencia de esta hexosa en glicoproteínas animales. Hoy se sabe que existe abundantemente por ejemplo en las enzimas sacarasa isomaltasa de intestino de conejo (37) y en oligoaminopeptidasas (formas F y S) de intestino de rata (38) entre otras. También Spiro et al (39, 40), observaron que la glucosa es un componente de glicoproteínas de varias preparaciones de membranas de tiroides. Por tanto, vemos que estructuras conteniendo glucosa pueden ser posibles, aunque por ahora se ha encontrado en un número reducido de glicoproteínas.

Recientemente Narasimhan et al (41) propusieron unas estructuras de glicopéptidos en función de los perfiles de elución



cular determinado por esta técnica sea correcto, es necesario que la cantidad de SDS unido por gramo de proteína sea igual tanto para la glicoproteína en cuestión como para las proteínas estándar utilizadas. Se sabe que la unión de detergentes a proteínas de membrana intrínsecas es frecuentemente anómalo (43, 44) y además las glicoproteínas presentan problemas especiales debido a que la presencia de grandes cantidades de carbohidrato puede afectar a la unión de detergente y al comportamiento hidrodinámico del complejo proteína-detergente.

Así Greffrath y Reynolds (45), estudiando la principal glicoproteína de la membrana de eritrocito, encuentran una unión de SDS completamente anómala observando que el nivel de saturación de SDS por la glicoproteína estaría entre 2,5 y 3,4 g de SDS por g de glicoproteína. Si además consideramos que esta glicoproteína posee un 55% de azúcar, resulta que se ligan de 5 a 7 g de SDS por g de proteína, si el detergente está unido solamente a la parte proteica. Las proteínas solubles en agua se considera que unen 1,4 g de SDS por g de proteína (46).

A pesar de todas estas posibles fuentes de error los experimentos de electroforesis en gel se usan con muchísima frecuencia para la determinación del peso molecular.

Para la determinación del peso molecular de la proteína que nos ocupa, la GP IIIa, hemos utilizado dos condiciones diferentes de SDS-PAGE y observamos que en condiciones de no reducción el peso molecular aparente de la GP IIIa no varía con la concentración de acrilamida utilizada (5 y 7%), siendo éste de 95.000. En condiciones de reducción, sin embargo, la movilidad

#### IV.4. HACIA UN POSIBLE MODO DE INSERCIÓN Y UNA PROBABLE FUNCIÓN DE LA GP IIIa EN LA MPPH

Nuestras experiencias a lo largo del presente trabajo nos sugieren que la GP IIIa es una proteína integral de membrana unida hidrofólicamente a la bicapa lipídica, pues permanece asociada a la membrana al ser sonicada ésta, y requiere para su solubilización en agua el uso de detergentes. Ahora bien, su alto contenido en aminoácidos polares nos indicaría que una gran parte de esta proteína, se encuentra fuera de la bicapa lipídica.

Se han realizado diversos estudios con plaqueta completa y MPPH encaminados a definir la localización de las diversas proteínas y glicoproteínas en la membrana, en los que la metodología empleada se basa en el uso de pruebas que modifican a las proteínas de la superficie celular. Los resultados con estas pruebas se toman como válidos si se cumplen los requisitos siguientes: a, que el procedimiento de modificación no altere la superficie de la membrana; b, que las proteínas tengan la misma orientación en cada una de las preparaciones que se comparen, y c, que la membrana sea impermeable a la prueba.

Aunque no es fácil conocer en que medida se han cumplido estas exigencias en los distintos estudios, sin embargo, los resultados obtenidos con una gran variedad de pruebas, conduce a pensar que la GP IIIa está muy accesible en la superficie externa de la célula (5, 9, 51).

Como ya hemos visto (7), la ausencia de GP IIB y GP IIIa en plaquetas trombásticas hace pensar que estas glicoproteínas

estén relacionadas con la agregación plaquetaria inducida por ADP. Igualmente la inducción en plaquetas normales de un comportamiento anómalo similar al de plaquetas trombásticas por el suero de un paciente con trombostenia de Glanzmann politransfundido con concentrados de plaquetas normales, también hace pensar que los antígenos correspondientes que son bloqueados por los anticuerpos de este suero están relacionados con la agregación plaquetaria y muy posiblemente se pueden identificar, aunque no está demostrado todavía, con las GP IIB y GP IIIA.

Ahora bien, esta participación de la GP IIIA en los fenómenos moleculares de agregación inducida por ADP habría que localizarla en etapas posteriores al reconocimiento y unión de ADP por la membrana, debido a que las plaquetas trombásticas unen cantidades normales de ADP (52), y responden a este estímulo con cambios de forma también normales (53). El defecto por tanto parece estar en la formación de fuerzas de unión necesarias para la formación final de agregados.

Firkin et al (54) estudiaron la interacción de plaquetas normales y trombásticas con Con A, tras tratamiento con formol durante 24 h, consiguiendo así plaquetas metabólicamente inactivas, de tal forma que las reacciones que se sucedieran serían dependientes únicamente de la interacción de la lectina con la superficie celular y no influiría para nada el metabolismo plaquetario. Estos autores observaron que a diferencia de las plaquetas normales, las plaquetas trombásticas apenas si se aglutinan por efecto de la Con A y además observaron también que las plaquetas trombásticas unen menos Con A que las normales, in-

dicando ésto la ausencia en estas plaquetas patológicas del receptor para la Con A, que nosotros postulamos puede ser la GP IIIa.

Esta ausencia de aglutinación originada por la ausencia de un receptor nos induciría a pensar que "in vivo", un papel posible para la GP IIIa dentro del mecanismo de agregación sería el de formar parte de un sistema endógeno lectina-receptor.

Además se sabe que las plaquetas poseen actividad lectínica (55), y si las plaquetas se pueden aglutinar por la acción de un extracto de estas mismas células, es lógico pensar en la existencia de un receptor para la lectina endógena, disponible sobre la superficie de la membrana plasmática de plaquetas intactas.

Esto podría sugerirnos la posibilidad de que la agregación plaqueta-plaqueta durante el proceso fisiológico de formación del coágulo pueda estar mediada por una interacción lectina-receptor, y que la ausencia de este receptor sea el que ocasione la falta de agregación en plaquetas patológicas.

Otra posible función para la GP IIIa sugerida en (7) , era la de considerar a la GP IIIa como el lugar de unión de la actina sobre la cara interna de la membrana, jugando así un papel en la contracción plaquetaria. Esto se basa en la suposición de Gerrard et al (56) de que las plaquetas trombásticas son deficientes en  $\alpha$ -actinina y sugieren la similitud entre GP IIIa y  $\alpha$ -actinina.

Como vimos en la introducción, tanto los contactos superficie de plaqueta-fibrina, como plaqueta-plaqueta, son los pun-

tos de arrastre que permiten al sistema de contracción plaquetario efectuar la retracción del tapón hemostático. En este sentido, si postulamos que la GP IIIa está implicada en estos puntos de unión plaqueta-plaqueta, también lo estará en el mecanismo de contracción del coágulo, lo que también se sugiere por el defecto en la retracción del coágulo en la trombastenia de Glanzmann.

Por último, si postulamos que el mecanismo de agregación se basa en una única unidad de control de función, puesta en marcha por los distintos efectores de agregación actuando sobre distintas unidades específicas de reconocimiento, cabría esperar :

- a) que las GP IIb y GP IIIa estuviesen estructuralmente próximas, pues permanecerían a la misma unidad de control de función;
- b) que el receptor de ristocetina, probablemente GC y GP Ib, también debería de estar relacionado con la unidad de control de agregación, ya que su activación pone en marcha a esta unidad, y su ausencia, por ejemplo en las plaquetas gigantes tipo Bernard Soulier, lleva consigo la falta de agregación por ristocetina, y
- c) que el resto de las unidades específicas de reconocimiento de efectores de agregación también deben de estar espacial o temporalmente relacionadas con esta unidad de control de función agregante.

IV.5. BIBLIOGRAFIA

- (1) BARBER, A.J., PEPPER, D.S. y JAMIESON, G.A. (1971)  
Thrombos. Diathes. Haemorrh. 26, 38.
- (2) SIXMA, J.J. y LIPS, J.P.M. (1978)  
Thrombos. Haemostas. 39, 328.
- (3) BARBER, A.J. y JAMIESON, G.A. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 6357.
- (4) TAYLOR, D.G. y CRAWFORD, N. (1974)  
FEBS Let. 41, 317.
- (5) GEORGE, J.N. (1978)  
J. Lab. Clin. Med. 92, 430.
- (6) CLEMETSON, K.J., PFUELLER, S.L., LUSCHER, E.F. y  
JENKINS, CH.S.P. (1977)  
Biochim. Biophys. Acta 464, 493.
- (7) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1979)  
Seminars Hematol. 16, 234.
- (8) PHILLIPS, D.R. y POH AGIN, P. (1977)  
J. Biol. Chem. 252, 2121.
- (9) OKUMURA, T. y JAMIESON, G.A. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 5944.
- (10) GEORGE, J.N. (1976)  
Thromb. Res. 8, 719.
- (11) ROSENBERG, S. y GUIDOTTI, G. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 5118.
- (12) SCHNEBLI, H.P. y ABRAMS, A. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 1115.

- (13) MARCHESI, S.L., STEERS, E., MARCHESI, V.T. y  
TILLACK, T.W. (1969)  
Biochemistry 9, 50.
- (14) MAZIA, D. y RUBY, A. (1968)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1005.
- (15) KAGAWA, Y. y RACKER, E. (1966)  
J. Biol. Chem. 241, 2461.
- (16) TZAGOLOFF, A. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 5020.
- (17) HORSTMAN, L.L. y RACKER, E. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 1336.
- (18) DATTA, A. y PENEFSKY, H.S. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 1537.
- (19) NURDEN, A.T. y CAEN, J.P. (1975)  
Nature 255, 720.
- (20) PODOLSAK, B. (1977)  
Thrombos. Haemostas. 37, 396.
- (21) PENEFSKY, H.S. y TZAGOLOFF, A. (1971)  
en Methods in Enzymology (Jacoby, W.B., ed.) Vol. XXII,  
pp. 204. Academic Press, New York.
- (22) TZAGOLOFF, A. y PENEFSKY, H.S. (1971)  
en Methods in Enzymology (Jacoby, W.B., ed.) Vol. XXII,  
pp. 219. Academic Press, New York.
- (23) LIS, H. y SHARON, N. (1973)  
Ann. Rev. Biochem. 42, 541.
- (24) JULIANO, R.L. (1978)  
en Current Topics in Membranes and Transport (Bronner, F. y

- Kleinzeller, A., eds.) Vol. 11, p. 117, Academic Press,  
New York.
- (25) DULANEY, J.T. (1978)  
Molec. Cell. Biochem. 21, 43.
- (26) NACHMAN, R.L., HUBBARD, A. y FERRIS, B. (1973)  
J. Biol. Chem. 248, 2928.
- (27) KAHANE, I., FURTHMAYR, H. y MARCHESI, V.T. (1976)  
Biochim. Biophys. Acta 426, 464.
- (28) LOTAN, R., BEATTIE, G., HUBBELL, W. y NICHOLSON, G.L. (1977)  
Biochemistry 16, 1787.
- (29) SHARON, N. y LIS, H. (1975)  
en Methods in Membrane Biology (Korn, E.D., ed.), Vol 3,  
p. 147, Plenum Press, New York.
- (30) HUNT, R.C., BULLIS, C.M. y BROWN, J.C. (1975)  
Biochemistry 14, 109.
- (31) ALLAN, D., AUGER, J. y CRUMPTON, M.J. (1972)  
Nature New Biol. 236, 23.
- (32) GOLDSTEIN, I.J. (1975)  
en Concanavalin A (Chowdhury, T.K. y WEISS, A.K., eds )  
p. 35, Plenum Press, New York.
- (33) DAVEY, M.W., SULKOWSKI, E. y CARTER, W.A. (1976)  
Biochemistry 15, 704.
- (34) ADAIR, W. y KORNFELD, S. (1974)  
J. Biol. Chem. 249, 4696.
- (35) CAPALDI, R.A. y VANDERKOOI, G. (1972)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 930.

- (36) NACHMAN, R.L. y FERRIS, B. (1972)  
J. Biol. Chem. 247, 4468.
- (37) COGOLI, A., EBERLE, A., SIGRIST, H., JOSS, C.,  
ROBINSON, E., MOSIMANN, H. y SEMENZA, G. (1973)  
Eur. J. Biochem. 33, 40.
- (38) KIM, Y.S. y BROPHY, E.J. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 3199.
- (39) SPIRO, M.J., SPIRO, R.G. y BHOYROO, V.D. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 6400.
- (40) SPIRO, M.J., SPIRO, R.G. y BHOYROO, V.D. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 6420.
- (41) NARASIMHAN, S., WILSON, J.R., MARTIN, E. y  
SCHACHTER, H. (1979)  
Can. J. Biochem. 57, 83.
- (42) OKUMURA, T., LOMBART, C.H. y JAMIESON, G.A. (1976)  
J. Biol. Chem. 251, 5950.
- (43) HELENIUS, A. y SIMONS, K. (1972)  
J. Biol. Chem. 247, 3656.
- (44) ROBINSON, N.C., NOZAKI, Y. y TANFORD, C. (1974)  
Fed. Proc. 33, 826.
- (45) GREFRATH, S.P. y REYNOLDS, J.A. (1974)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3913.
- (46) REYNOLDS, J.A. y TANFORD, C. (1970)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 1002.
- (47) ABERNETHY, J.L., STEINMAN, H.M. y HILL, R.L. (1974)  
J. Biol. Chem. 249, 7339.

- (48) DUNKER, A.K. y KENYON, A.J. (1976)  
Biochem. J. 153, 191.
- (49) CLARKE, S. (1975)  
J. Biol. Chem. 250, 5459.
- (50) REYNOLDS, J.A. y TANFORD, C. (1976)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 4467.
- (51) PHILLIPS, D.R. (1972)  
Biochemistry 11, 4582.
- (52) LEGRAND, C. y CAEN, J.P. (1976)  
Haemostasis 5, 231.
- (53) CAEN, J.P. y MICHEL, H. (1972)  
Nature 240, 148.
- (54) FIRKIN, B.G., HENDRIX, L. y GOH, A. (1978)  
Thromb. Res. 13, 337.
- (55) BOWLES, D.J. y ROTMAN, A. (1978)  
FEBS Let. 90, 283.
- (56) GERRARD, J.M., SCHELLMEYER, J.V., PHILLIPS, D.R. y  
WHITE, J.G. (1979)  
Am. J. Pathol. 94, 509.

CAPITULO V.- CONCLUSIONES

- Membranas plasmáticas de plaqueta humana, obtenidas mediante la técnica de carga con glicerol y lisis, y analizadas por SDS-PAGE empleando diferentes condiciones experimentales, muestran la existencia de al menos seis glicoproteínas denominadas GP Ia, GP Ib, GP IIa, GP IIb, GP IIIa y GP IIIb, de acuerdo con la mayor parte de la bibliografía reciente. También se encontraron evidencias preliminares que indican que GP IIa y GP IIb son posiblemente la misma glicoproteína en distintos estados de reducción.
- La solubilización de MPPH con DchNa alcanza el 85% de las proteínas totales y es ligeramente selectiva, mientras que con SDS la solubilización de proteínas alcanza el 95% y no es nada selectiva. La sonicación de MPPH por el contrario, solubiliza solamente alrededor del 27% de estas proteínas, y de entre las glicoproteínas es la GP Ib la que se solubiliza mayoritariamente, lo que parece indicar su naturaleza extrínseca.
- Mediante combinación de cromatografía de exclusión con cromatografía de afinidad se consiguió el aislamiento de una fracción de glicoproteína de MPPH con alta afinidad por la Con A y cuyo comportamiento electroforético permitió demostrar que se trataba de la GP IIIa. Esta fracción de glicoproteína electroforéticamente pura y monomérica, muestra una heterogeneidad

todavía no dilucidada al ser estudiada mediante ultracentrifugación analítica.

- La composición centesimal de la GP IIIa aislada es de 72% de proteína, 24,5% de hexosas y 3,5% de hexosaminas. Análisis de aminoácidos mostraron una relación de aminoácidos ácidos a básicos de 2:1, y un contenido relativamente alto de cisteína y aminoácidos polares. Por otro lado, el análisis de azúcares muestra una relación entre los diferentes monosacáridos de Man:Gal:Glc:Hexosaminas:NANA 2,3:1,3:2,7:1:0. El volumen específico calculado teniendo en cuenta esta composición química es de  $0,693 \text{ ml.g}^{-1}$ .
- El peso molecular aparente de la GP IIIa obtenido mediante electroforesis en condiciones no reductoras resultó ser 95.000, mientras que en condiciones reductoras disminuye su movilidad electroforética, siendo el peso molecular aparente en estas condiciones de 110.000. Estas variaciones de la movilidad electroforética con la reducción se relacionan con puentes disulfuro intramoleculares.
- Por último, el modelo primitivo, estructural y funcional que se postula para la GP IIIa en la MPPH es el siguiente:
  - a) Los estudios de solubilización de MPPH mediante detergentes y ultrasonidos y la composición química de la GP IIIa permiten deducir que esta glicoproteína es una proteína intrínseca de membrana, si bien anclada en la bicapa lipídica por una porción relativamente pequeña de la molécula,

posiblemente enriquecida en residuos no polares, lo que es tá de acuerdo con los estudios de marcaje y digestión proteolítica de esta protefna en membrana y células completas.

- b) Igualmente, la disminución o ausencia de GP IIB y GP IIIa y los defectos de agregación plaquetaria y retracción del coágulo en plaquetas de enfermos con trombastenia de Glanzmann, permiten relacionar estas glicoproteínas con alguna etapa molecular de los fenómenos de agregación y retracción. Además, si se admite que el mecanismo de agregación se basa en una única unidad de control de función puesta en marcha por distintos efectores de agregación actuando sobre distintas unidades de reconocimiento, cabría esperar, por un lado que GP IIB y GP IIIa perteneciesen a la misma unidad de control de función y por tanto estuviesen estructuralmente relacionadas, y por otro lado, que tanto el receptor de ristocetina, probablemente glicocalicina y GP Ib, como el resto de las unidades específicas de reconocimiento de efectores de agregación también estuviesen espacial o temporalmente relacionados con la GP IIIa.

