

03072
221



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES.

"ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA
AGREGACION PLAQUETARIA POR
LA SALIVA DEL MURCIELAGO
HEMATOFOGO".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A

ING. AGRONOMO ESPECIALISTA EN EDUCACION AGROPECUARIA
ELEUTERIO ASTORGA CHAIDEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION -----	1
Plaquetas y Hemostasis -----	5
Características generales de la agregación plaquetaria -----	11
Algunos inhibidores de la agregación plaquetaria con uso clínico actual o potencial -----	12
II. MATERIALES -----	13
a) Equipo y material -----	13
b) Reactivos -----	14
III. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES -----	15
1.- Extracción de la saliva -----	15
2.- Extracción de la sangre y obtención del PRP -----	16
3.- Siliconización de vidriería -----	17
4.- Ensayo de inducción e inhibición de la agregación plaquetaria -	17
5.- Cuantificación de plaquetas -----	19
6.- Obtención de un extracto de papa con actividad de apirasa ----	20
7.- Medición de la actividad de apirasa -----	21
8.- Detección de la actividad de fosfatasa alcalina -----	22
9.- Detección de la actividad de activador de plasminógeno -----	22
IV. RESULTADOS -----	24
1.- La saliva del vampiro no tiene actividad de apirasa -----	25
2.- La inhibición de la agregación plaquetaria por la saliva del vam- piro ocurre con todos los inductores de la agregación probados ----	27
3.- La actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria no puede de- tectarse con claridad, pero sí otras de sus actividades biológicas	42
4.- El componente inhibidor parece ser de naturaleza proteica ----	50
V. DISCUSION -----	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.-----	62

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
1.- Mecanismos de la hemostasis -----	1
2.- Hemostasis e inflamación -----	2
3.- Proceso de la coagulación sanguínea -----	4
4.- Degradación del coágulo de fibrina -----	5
5.- Rutas estimuladora e inhibitoria que modulan la respuesta secretoria en plaquetas humanas -----	8
6.- Esquema hipotético mostrando 3 rutas diferentes que conducen a la agregación plaquetaria -----	10
7.- Curva estándar de cuenta plaquetas -----	20
8.- Actividad fibrinolítica de saliva dializada -----	24
9.- Actividad de fosfatasa alcalina en la saliva de <i>D. rotundus</i> -----	26
10.- Agregación plaquetaria inducida por ADP -----	30
11.- Cinética de agregación plaquetaria inducida por ADP -----	31
12.- Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP con diferentes cantidades de saliva. -----	32
13.- Agregación plaquetaria inducida por epinefrina. -----	34
14.- Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina por diferentes cantidades de saliva. -----	35
15.- Agregación plaquetaria inducida por colágena. -----	37
16.- Inhibición de la agregación inducida por colágena con diferentes cantidades de saliva. -----	38
17.- Agregación plaquetaria inducida por FAP. -----	40
18.- Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por FAP con diferentes cantidades de saliva. -----	41
19.- Filtración en una columna de Sephadex G-150 de saliva de vampiro.-----	44
20.- Filtración en gel de saliva liofilizada y actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de las fracciones obtenidas. -----	45
21.- Actividad de fosfatasa alcalina en las fracciones obtenidas después de cromatografiar saliva de vampiro en Sephadex G-150. -----	47
22.- Detección de activador de plasminógeno en el cromatograma de saliva en Sephadex G-150. -----	48
23.- Patrones electroforéticos de las fracciones obtenidas después de	

la filtración en gel Sephadex G-150. -----	49
24.- Inhibición de la agregación plaquetaria por saliva de vampiro dializada. -----	51
25.- Inhibición de la agregación plaquetaria por saliva nativa y saliva desnaturalizada por calor. -----	52
26.- Inhibición de la agregación plaquetaria con las muestras digeridas con tripsina. -----	54
27.- Análisis electroforético de las fracciones digeridas con tripsina.-----	55

I. INTRODUCCION

Se sabe que en las salivas de los animales hematófagos se encuentran compuestos que interfieren con los mecanismos de la coagulación de la sangre o hemostasis (Figura 1) en las lesiones causadas a los animales de los que se alimentan^(1 a 3). Entre las especies hematófagas que se han explorado están las chinches triatomas, ciertos mosquitos, las moscas de la arena, las moscas tsetse, las garrapatas, las sanguijuelas y los murciélagos vampiro. J.M.C. Ribeiro propone un diagrama altamente esquemático de los eventos relevantes de la hemostasis y la inflamación que ocurren en los sitios de alimentación de los artrópodos hematófagos (Figura 2).

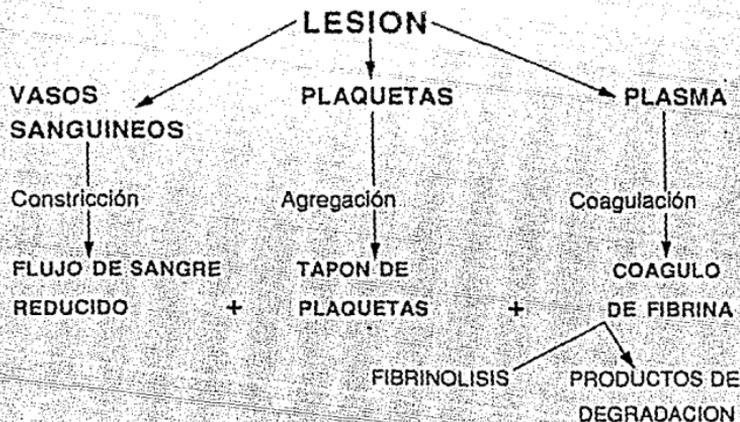


Figura 1. MECANISMOS DE LA HEMOSTASIS

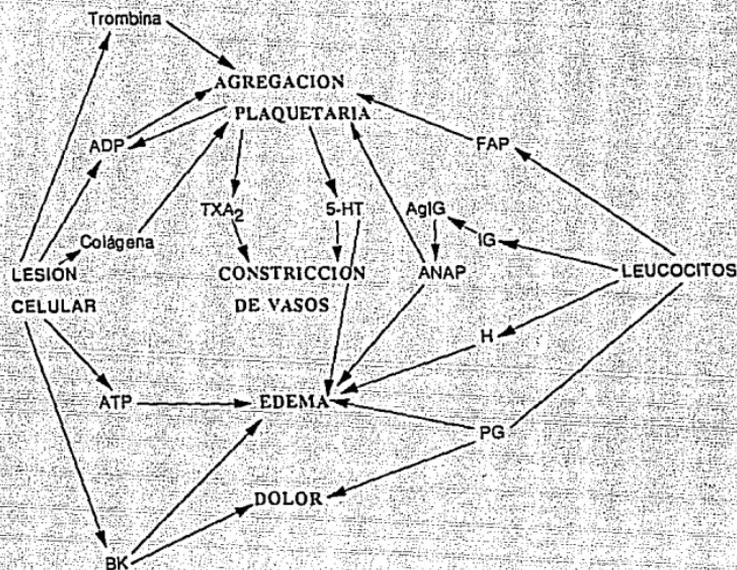


Figura 2. HEMOSTASIS E INFLAMACION. En la izquierda se indican los mediadores liberados a consecuencia de la lesión celular. En la parte central, los fenómenos causados por los mediadores. A la derecha están las contribuciones de los leucocitos a la hemostasis e inflamación. Abreviaciones: ANAP, anafilotoxina; BK, bradikinina; H, histamina; 5-HT, serotonina; IG, inmunoglobulinas; AgIG, inmunocomplejos; FAP, factor activador de plaquetas; PG, prostaglandinas; TXA₂, tromboxano A₂.

En 1967 Christine Hawkey⁽⁴⁾ encontró que en la saliva del murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, mamífero completamente hematófago^(5, 6), se encuentran por lo menos tres principios que interfieren con los mecanismos normales de la coagulación sanguínea: un activador de plasminógeno, un inhibidor del llamado tiempo de cefalina y un inhibidor de la agregación de

plaquetas humanas, cuando la inducción de la agregación es por ADP o trombina.

Nuestro laboratorio, dentro de un convenio con la compañía Schering de Berlín, ha estado estudiando, durante los últimos años, al activador de plasminógeno que está presente en la saliva del vampiro. Este trabajo está ya muy avanzado y se está protegiendo mediante la solicitud de varias patentes. Así, y con el objeto de explorar otras moléculas con actividades biológicas relevantes y con potencial terapéutico, es que nos dimos a la tarea de iniciar el estudio sistemático de otra de las actividades que está presente en la misma saliva: la inhibición de la agregación plaquetaria. En esta tesis se reportan éstos estudios.

En la actualidad es muy activa la búsqueda de nuevos compuestos como alternativas o complementos a los que actualmente se usan o están en desarrollo para el tratamiento de enfermedades tromboembólicas, como el activador de plasminógeno tisular, la estreptocinasa, la urocinasa, la hirudina, la ticlopidina, la heparina, etc^(7 a 10). Con ellos se pretende evitar la formación de coágulos sanguíneos (Figura 3), y/o disolver los que ya están formados⁽¹¹⁾, (Figura 4), o bien, inhibir la agregación plaquetaria.

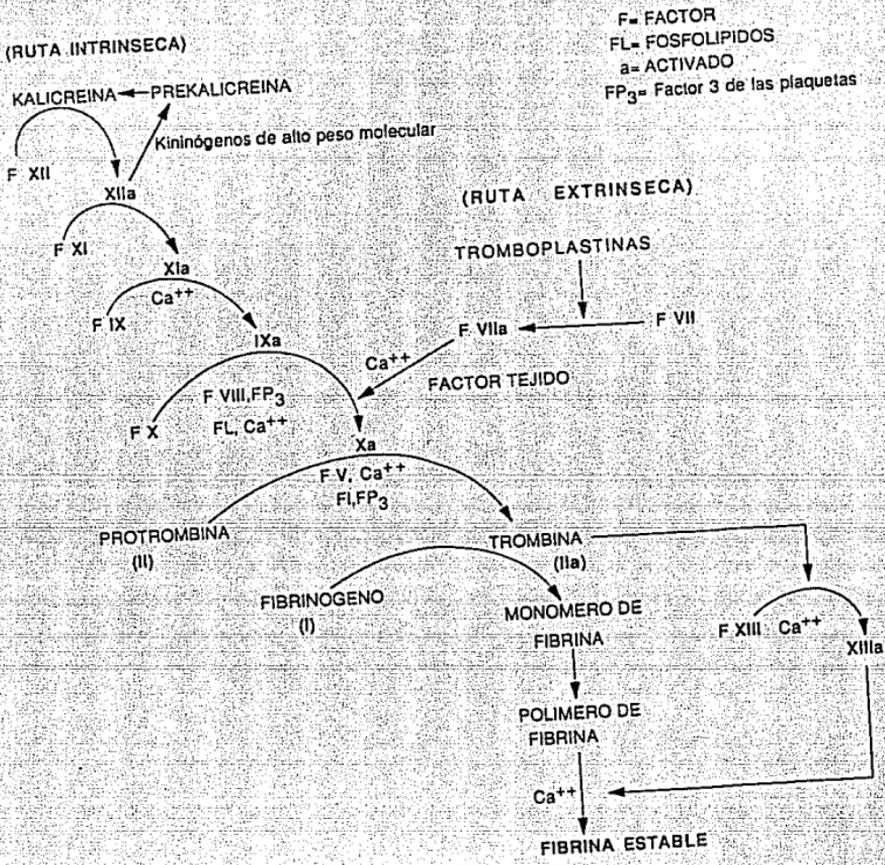


Figura 3. PROCESO DE LA COAGULACION SANGUINEA. RUTAS INTRINSECA Y EXTRINSECA. Las plaquetas estimuladas secretan entre otras sustancias al factor 3 plaquetario y el factor von Willebrand (Factor VIII) que activanan a los factores X y II , además de secretar fibrinógeno (Factor I).

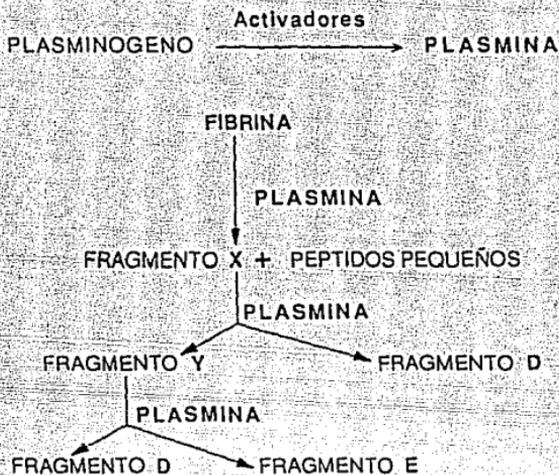


Figura 4. DEGRADACION DEL COAGULO DE FIBRINA POR PLASMINA. La saliva de vampiro tiene activadores de plasminógeno que catalizan la conversión de éste a plasmina, la cual degrada los coágulos de fibrina.

PLAQUETAS Y HEMOSTASIS:

El papel más importante de las plaquetas es en la fase inicial de la hemostasis⁽¹²⁾, ya que reaccionan de 1 a 2 segundos después de ocurrir la lesión adhiriéndose a la colágena, fragmentos de la membrana basal y microfibrillas asociadas con la elastina⁽¹³⁾. El proceso continúa con la secreción de las plaquetas, denominado reacción de liberación, lo que les ocasiona un cambio morfológico, de discoide a esférico, con formación de prolongaciones, pseudópodos, ampollas y microvellos, y un aumento de más de 3 veces en su relación área/volumen; lo cual a su vez lleva a la agregación

plaquetaria, es decir, el depósito de nuevas plaquetas sobre las plaquetas adheridas inicialmente a las áreas lesionadas del endotelio vascular. El término "agregación" se hizo extensivo también al fenómeno de agregación inducido por varios agentes químicos *in vitro*; ésta ha sido dividida en dos fases: la agregación primaria o de primera fase a la determinada directamente por el agente inductor exógeno (ADP, adrenalina, serotonina, trombina y ristocelina), y agregación secundaria o de segunda fase a la determinada por el ADP procedente de la reacción de liberación de las plaquetas. El ADP, al fijarse a su receptor, modifica la glicoproteína de membrana IIb-IIIa de la plaqueta⁽⁷⁾ y este complejo activado se convierte en un receptor de una proteína circulante, el fibrinógeno, que forma puentes entre las plaquetas desencadenando su agregación, para formar un tapón hemostático primario. Las plaquetas así activadas tienen también la capacidad de activar la cascada de la coagulación, en particular, la ruta intrínseca (Figura 3), ya que liberan lipoproteínas que inducen la generación del factor XIa en la atmósfera periplaquetaria y son fuente del factor V (proacelerina) y VIIIc (parte del complejo del factor VIII)

Las plaquetas tienen forma de discos engrosados en la parte central o esféricas y un diámetro alrededor de 2 μm . Son producidas en la médula ósea por los megacariocitos. El número de plaquetas promedio en sangre venosa de un adulto humano normal es de 240,000 a 350,000 por mm^3 y en sangre capilar es de 242,000 a 409,000⁽¹⁴⁾.

En la reacción de liberación de las plaquetas se secretan sustancias tales como ADP, serotonina, tromboxano A_2 (TXA_2) y el factor de plaquetas 4 (una proteína que se une a la heparina) como respuesta a inductores de la agregación como trombina, colágena, epinefrina y ADP que actúan sobre

receptores específicos en la membrana plaquetaria⁽¹⁵⁾. La interacción de los inductores con los receptores genera una señal que activa a la fosfolipasa A₂ y/o a la fosfolipasa C; se sabe que la activación de la primera está influenciada por la bomba Na⁺/H⁺ y la segunda, por las proteínas que unen GTP (proteínas G). Se propone que las moléculas mensajeras derivadas de fosfolípidos (ácido araquidónico, diacilglicerol e inositol-1,4,5- trifosfato) procediendo en rutas distintas (Figura 5, líneas sólidas remarcadas) intervienen para que posteriormente se llegue a inducir la secreción plaquetaria por las rutas de la ciclooxigenasa, la proteína cinasa C y la cinasa de cadena ligera de la miosina. En la ruta de la ciclooxigenasa la actividad enzimática ocasiona la formación de endoperóxidos cíclicos llamados prostaglandinas G₂ y H₂, los cuales son convertidos al tromboxano A₂ por la sintetasa del tromboxano, presente en los microsomas y por las otras rutas las proteínas se fosforilan, siendo éstas y el TXA₂ los inductores directos de la respuesta secretoria plaquetaria. El ión Ca²⁺ como mensajero intracelular está involucrado en varios pasos clave de cada una de las rutas estimulatorias.

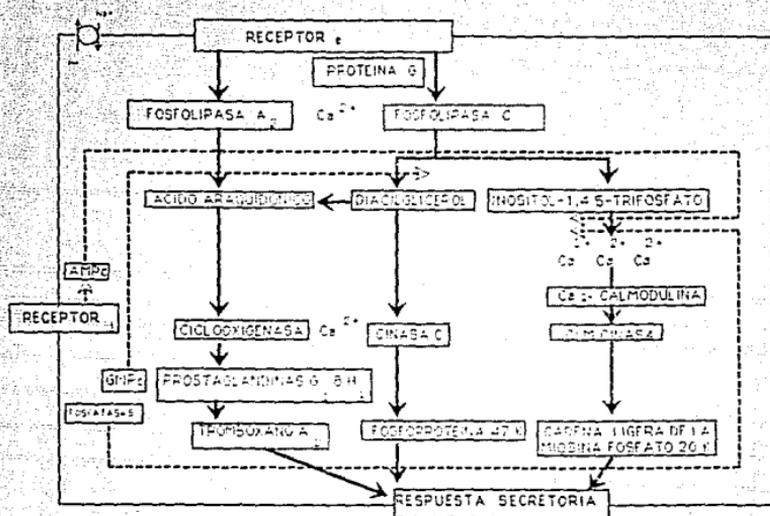


Figura 5. Diagrama simplificado de las rutas estimuladora e inhibitoria que modulan la respuesta secretoria en las plaquetas humanas.

Las rutas inhibitorias involucran receptores para inhibidores (como prostaglandina I_2 , E_2 y adenosina) que una vez unidos a la adenilato ciclasa la estimulan incrementando el nivel intracelular de AMP cíclico. Se propone además que la guanilato ciclasa soluble es independientemente activada por el factor de relajamiento derivado del endotelio y se identifica como óxido nítrico el cual interactúa con las plaquetas. Es conocido que los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc (los que se representan con las líneas discontinuas en la Figura 5) interrumpen las rutas estimuladoras, y que los inhibidores de agregación plaquetaria incrementan el AMPc intracelular por la estimulación

de la adenilato ciclasa la cual cataliza la conversión del ATP al AMP cíclico, o la inhibición de la fosfodiesterasa (que actúa sobre el AMPc convirtiéndolo a 5'AMP) o actúan en otros puntos no conocidos de la ruta que elevan el nivel del AMPc⁽¹⁶⁾.

Por otro lado se ha observado que las fosfatasa intracelulares también ejercen un control negativo desfosforilando el inositol 1,4,5-trifosfato y las fosfoproteínas involucradas en las rutas estimuladoras (considerando que la fosforilación de las proteínas, al disminuir el nivel de AMPc, estimula la respuesta secretoria de las plaquetas).

Vargafli, Chignard y Benveniste⁽¹⁷⁾ propusieron un esquema en sistema hidráulico sobre tres diferentes rutas que conducen a la agregación de plaquetas cuando se induce con colágena, trombina, ionóforo de calcio, factor activador de plaquetas o FAP (1-O-alkil-2-O-acetil-2sn-gliceril-3-fosforilcolina), ácido araquidónico (AA) y ADP (véase la Figura 6). En el esquema, los diferentes agentes de agregación funcionan como pistones específicos, así el ionóforo, la trombina y la colágena presionan sobre la fosfolipasa A_2 , cuya presión puede ser cancelada con la llave de paso representada por el bromuro de bromofenacilo o el dibutiril AMPc. El paso por la fosfolipasa A_2 puede ser evitado e inducirse la agregación adicionando directamente al sistema AA, FAP o ADP. Después de pasar por el sistema enzimático de la ciclooxigenasa (CO), el AA origina al tromboxano A_2 el cual induce la agregación directamente e indirectamente por transmisión de presión al ADP. El mismo mecanismo es aplicable al FAP, el cual actúa directamente, o indirectamente vía ADP. Este modelo no toma en cuenta la actividad enzimática de la fosfolipasa C ya que, como se mencionó arriba (Figura 5), los ácidos fosfatídico y lisofosfatídico pueden jugar un papel en la agregación. Por otra parte se observa en el esquema de la Figura 6 que

cuando la CO es inhibida por drogas antiinflamatorias no esteroideas (DAINE) como la aspirina, y el ADP es capturado o removido por cualquier medio, el tercer mecanismo (FAP) aún funcionará. De hecho, sólo los inhibidores de la fosfolipasa A₂ pueden bloquear las tres rutas juntas.

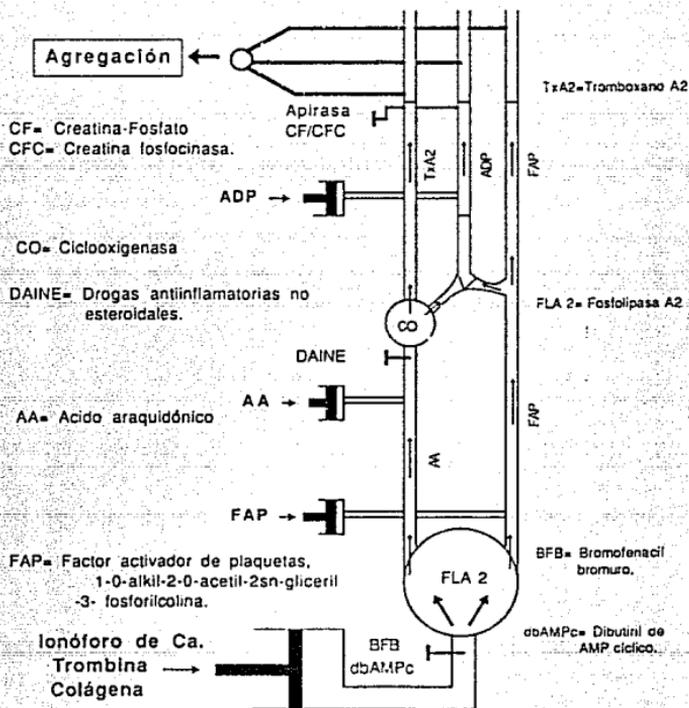


Figura. 6. Esquema hipotético mostrando tres rutas diferentes que conducen a la agregación plaquetaria.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA AGREGACION PLAQUETARIA.

Las plaquetas se "pegan" aglomerándose entre sí cuando son estimuladas por un agonista⁽¹⁸⁾. Los agonistas son muy diversos, pueden ser compuestos de bajo peso molecular como ADP, serotonina y epinefrina; enzimas tales como trombina y tripsina; material particulado como la colágena y complejos antígeno-anticuerpo; lípidos tales como el factor activador de plaquetas (FAP), e ionóforos tales como el A23187. Estos agonistas inducen cambios en la membrana de las plaquetas ocasionando su agregación bajo condiciones apropiadas.

Para que suceda la agregación, las plaquetas deben de entrar en contacto una con otra, lo cual normalmente se logra agitando la suspensión plaquetaria (PRP + amortiguadores + agonistas, en nuestro caso). Esta agregación es detectada, a nivel macroscópico por la formación de conjuntos visibles de plaquetas "pegadas" o agregadas, clareándose así la suspensión.

La agregación plaquetaria constituye un proceso de varios pasos, el cual puede analizarse registrando los cambios en la transmisión (o absorbancia) de la luz (mediante un espectrofotómetro) durante su desarrollo. Después de la adición de algún agonista hay un leve decremento inicial en la transmisión (o incremento de la absorbancia) de la luz debido al cambio morfológico de las plaquetas, de formas discoides a esféricas; lo anterior es seguido de un incremento gradual significativo en la transmisión (o decremento en la absorbancia) de la luz por la formación de agregados plaquetarios y el consecuente aclareamiento de la suspensión de plaquetas.

La fase inicial de la agregación de las plaquetas es reversible a no ser que esté seguida de una secreción de factores "proagregantes" de las mismas

a través de sus gránulos densos (por ejemplo ADP y serotonina) y gránulos α (proteínas adhesivas como el fibrinógeno, factor von Willebrand, trombospondina y fibronectina); esta fase de la agregación plaquetaria es irreversible y alcanza un plató que refleja el máximo nivel de transmisión (o mínimo nivel de absorbancia) de la luz.

Para que la agregación plaquetaria ocurra se requiere de la presencia de fibrinógeno y cationes divalentes, ya que la característica adhesiva o "pegajosa" de las plaquetas se consigue cuando sus membranas adquieren la capacidad de unir fibrinógeno. Esta molécula dimerica probablemente actúa como un pegamento que funge de puente en los huecos intraplaquetarios. Esto se logra con estímulos que pueden inducir la secreción sin una agregación previa, como es el caso de la trombina o la colágena, el fibrinógeno puede secretarse de los gránulos α ; mientras que otros estímulos requieren que suceda la agregación para ocasionar la secreción plaquetaria, por ejemplo el ADP y la epinefrina, los cuales necesitan que el fibrinógeno en fase fluida esté presente. El "pegado" de las plaquetas mediante el fibrinógeno, esto es la agregación, también requiere la presencia de cationes divalentes (como el Ca^{2+}) y ocurre a través de puentes entre la glucoproteína IIb-IIIa presente en la superficie de las plaquetas y el fibrinógeno.

ALGUNOS INHIBIDORES DE LA AGREGACION PLAQUETARIA CON USO CLINICO ACTUAL O POTENCIAL

El inhibidor de agregación plaquetaria de uso más extendido es la aspirina, que sobretodo se emplea para la prevención de fenómenos tromboembólicos en pacientes quirúrgicos de alto riesgo. Su mecanismo de acción depende de su capacidad para inhibir la ciclooxigenasa con lo que se

bloquea la síntesis de tromboxano A₂. Sin embargo, tiene el problema de que también inhibe la síntesis de prostaciclina, un potente agente antiagregante secretado por las células de la pared arterial^(7,19,20), por lo que su eficacia se ve reducida. Además, el uso prolongado de aspirina conlleva problemas en algunos de los pacientes (sangrado de tubo digestivo alto, úlcera gástrica, etc) que limitan su empleo.

La ticlopidina, desarrollada por el grupo Sanofi de Francia, inhibe la agregación plaquetaria al impedir la fijación del fibrinógeno a la glucoproteína IIb-IIIa⁽⁷⁾. Este compuesto está en la actualidad evaluándose en gran escala y tiene un potencial muy alto en la prevención de trombopatías durante tiempos largos.

II. MATERIALES

a) EQUIPO Y MATERIAL:

Centrífuga clínica modelo T J-8 , micrófuga B, espectrofotómetro UV/Visible modelo DU-8 de Beckman Instruments, Inc.(USA); medidor de pH "PHM Standard pH meter" y conductímetro 0.2 tipo CDM 2f de Radiometer Copenhagen (Dinamarca); liofilizadora "Labconco" modelo 75050 de Labconco Corp. (USA); aparato para electroforesis "LKB-Producter AB 5-16126" de Bromma (Suecia); baño de agua "thermomix 1420" de B. Braun Melsungen AG (Alemania); balanza analítica "Mettler H80" de Mettler instrumente AG (Alemania Occidental); agitador "Orbital Shaker" y agitador múltiple magnético "Bell-Stir Multi-Stir" de Bellco Glass Inc. (USA); balanza B1500D y

balanza DIAL-O-GRAM 2Kg. de Ohaus Scale Corp. (USA); estufa "Imperial II de Lab-Line instruments Inc. (USA); microscopio óptico (de luz) max. 100X "Micro star" de AO Scientific instruments (USA); agitador con movimiento ondulante suave "Adams Nutator" de Clay Adams (USA), agitador para tubos vortex "Deluxe mixer" de Scientific products (USA), pipetas automáticas "pipetman" de 20, 200 y 1000 μ l de Gilson (USA), jeringas de 10 y 100 μ l "Hamilton" de Hamilton Co.(USA), cubetas de poliestireno para leer en el espectrofotómetro de Fisher Costar Scientific Co. (USA); pipetas capilares pasteur de Costar (USA), tubos de 15 y 50 ml de poliestireno con tapaderas de rosca; tubos para centrifuga de poliestireno de 25 mm de diametro por 95 mm de largo; barras magnéticas cubiertas de polietileno para agitar; jeringas de 10 y 20 ml de plástico; cámaras pequeñas para geles verticales; hematocitómetros y cronómetros.

b) REACTIVOS:

1.- De J.T. Baker S.A. : dicromato de potasio, heptamolibdato de amonio, ácido tricloroacético, bicarbonato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, citrato de sodio, cloruro de magnesio, ácido nítrico, carbonato de sodio, formaldehído, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, tolueno, metanol, etanol y cloruro de sodio.

2.- De Sigma Chemicals Co.(USA) : arsenito de sodio, ácido ascórbico, trizma base (TRIS), L- α -fosfatidilcolina, β -acetil- γ -O-*alquil* (PAF), colágeno de cola de rata ácido soluble, albúmina sérica bovina (grado reactivo), p-nitrofenil fosfato (PNP), fibrinógeno, trombina, inhibidor de tripsina de soya, ácido ϵ -amino caproico, difosfato de adenosina (ADP), nitrato de plata y glicina.

3.- De BIO-RAD laboratories: acrilamida, TEMED, persulfato, azul dextrán, sulfato de dodecil de sodio (SDS) y azul de coomasie.

4.- De Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex G-150, aldolasa y marcador de peso molecular.

5.- De Aldrich Chemical Co: cloruro de calcio.

6.- De Fisher Scientific Co.: acetato de sodio.

7.- De Laboratorios Pisa: clorhidrato de epinefrina (solución).

8.- De Laboratorios Sophia S.A.: pilocarpina sol. 4% "Pil ofteno C.M.C."

9.- De Bethesda Research Laboratories: agarosa.

10.- De Pierce Chemical Co.: Surfácil (agente siliconizante).

11.- De Merck Schuchardt: glutaldehído.

12.- De Mallinckrodt Co.: barbital.

13.- De Reproducción Animal S.A. de C.V.: nitrógeno líquido.

III. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

1.- EXTRACCION DE LA SALIVA:

La saliva fue obtenida de los murciélagos vampiros *Desmodus rotundus* después de ser atrapados en las cuevas de zonas tropicales ganaderas de los Estados de Morelos y Guerrero; luego se conservaron en cautiverio por semanas y hasta meses. Se alimentaban diariamente con sangre de res tratada con citrato de sodio 109 mM. La secreción de la saliva se estimuló depositando una gota de pilocarpina al 0.4% (diluida con agua destilada) en la boca del vampiro o inyectada intraperitonealmente, 25 y 100 μ l por animal, respectivamente.

La saliva se recolectó con pipetas pasteur directamente de la boca y se depositó en tubos eppendorf de 1.5 ml en hielo y luego se centrifugaba 1 minuto en una micrófuga y la saliva clarificada se liofilizó (con 50 mg de manitol por ml) y se conservó a -20° C. La saliva resuspendida con amortiguador Tyrode modificado (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHCO_3 12 mM y TRIS/HCl 5 mM a pH 7.4) en el volumen original (generalmente 4 ml), se sometía un minuto en la micrófuga para descartar macroagregados.

2.- EXTRACCION DE LA SANGRE Y OBTENCION DEL PRP:

La sangre fue extraída de personas voluntarias sanas, en ayunas, que antes de la extracción no habían tomado medicamentos durante dos semanas, ni habían fumado al menos en la hora precedente; se usaron jeringas desechables de 10 y 20 ml, dependiendo del volumen requerido. Inmediatamente se vertía la sangre en un tubo de poliestireno con tapa que contenía citrato de sodio 107 mM en una relación sangre:citrato 10:1 (V/V), para centrifugarse a 230 g (1050 RPM en la centrifuga clínica Beckman) a temperatura ambiente ($\approx 24^{\circ}$ C) durante 15 minutos. Cuidadosamente se removía el sobrenadante amarillento (plasma y plaquetas) denominado plasma rico en plaquetas (PRP) con una pipeta pasteur silicónizada y se transfería a otro tubo de poliestireno graduado a fin de medir el volumen y adicionar 10 mg de ácido e-amino caproico por ml de PRP para inhibir el activador de plasminógeno⁽⁴⁾ de la saliva y evitar interferencia de los productos de degradación de fibrinógeno. El PRP así pretratado se usó en los ensayos de agregación y/o inhibición.

3.- SILICONIZACIÓN DE VIDRIERIA:

En todos los experimentos con sangre o PRP se evitó que entraran en contacto con vidrio, ya que esto estimula la ruta extrínseca de la coagulación (Figura 3) y/o se induce la agregación de las plaquetas, formándose coágulos de fibrina o agregados plaquetarios, respectivamente. Por tal motivo, las pipetas pasteur, tubos de vidrio y cubetas para espectrofotómetro fueron siliconizadas. Nosotros utilizamos Surfácil en tolueno en la proporción 10:1 (V/V), sumergiendo la vidriería durante 30 minutos y dejándose secar en una campana de extracción. Por último se enjuagaban con agua destilada y se secaban a temperatura ambiente.

4.- ENSAYO DE INDUCCION E INHIBICION DE LA AGREGACION PLAQUETARIA:

Una vez obtenido el PRP, en un tubo de poliestireno con tapadera, se incubaba en un baño de agua a 37° C y se mantenía así durante el transcurso de todos los ensayos, sin exceder 5 horas desde el momento de la extracción de la sangre, porque después de este tiempo bajaba la reactividad de las plaquetas. Se lee el PRP en el espectrofotómetro en absorbancia a 600 nm en cubeta de poliestireno, ajustándose a cero con salina (NaCl 0.154 M, pH 7.4). Este registro de la A_{600} nos dió aproximadamente el número de plaquetas por unidad de volumen de PRP. Se recomienda que la población sea $\geq 2.9 \times 10^8$ plaquetas por ml de PRP⁽²¹⁾ ($A_{600} \geq 0.6$). En un tubo de poliestireno de centrifuga de 25 mm X 95 mm se introdujo un imán pequeño cubierto de polietileno, que se acomodó sobre un agitador magnético que estaba justo debajo del baño de agua a 37° C. se depositaron 400 μ l de PRP en el tubo con

la barra imanada, adicionándole 200 μ l ya sea de saliva (de 1.25 a 2.5 mg/ml generalmente) ó 200 μ l de solución Tyrode y se preincubaba durante 5 min a 37°C. Después de la preincubación (tiempo cero) se adicionaba el inductor de agregación correspondiente y a la concentración que se indica en los experimentos en un volumen de 200 μ l o el amortiguador respectivo como control. Tanto la preincubación como la incubación se hicieron bajo agitación, sólo que la primera se realizó suavemente (número 2 del agitador magnético) y la segunda en forma vigorosa (número 6 del agitador). La lectura inicial (tiempo cero) se toma después de un golpe (=1 seg) de agitación vigorosa, se suspende la agitación y se lee rápidamente A_{600nm} contra salina. Este proceso se repite cada 30 seg, durante 5-7 min, en los que la mezcla se agita. Obtenidos los datos se procede a graficar.

Para calcular los porcentajes de agregación e inhibición de las plaquetas observados en las gráficas de los resultados se siguió el procedimiento siguiente:

- 1) Se ajustaron los valores reales de A_{600nm} a porcentajes en relación a la absorbancia a tiempo cero (A_{t_0}), tanto el control como la muestra. Esto es, se consideró la A_{t_0} como 100%.
- 2) Se calculó el cambio porcentual en absorbancia del control (Δc) al tiempo utilizado (usualmente a los 5 minutos): $\Delta c = 100 - \% \Delta c_{t_n}$.
- 3) Se calculó el cambio porcentual en absorbancia de la muestra (Δm) al tiempo deseado (generalmente a 5 min.): $\Delta m = 100 - \% \Delta m_{t_n}$.

4) Para el cálculo del % de inhibición (%I) se empleó:

$$\%I = \frac{(\Delta C - \Delta m)(100)}{\Delta C}$$

Para calcular directamente los porcentajes de inhibición se recurrió al siguiente algoritmo:

$$\%I = \left[\frac{(1 - A_{c_{t_n}} + A_{c_{t_0}}) - (1 - A_{m_{t_n}} + A_{m_{t_0}})}{(1 - A_{c_{t_n}} + A_{c_{t_0}})} \right] (100);$$

donde

$A_{c_{t_n}}$ = absorbancia del control al tiempo deseado,

$A_{c_{t_0}}$ = absorbancia del control al tiempo cero,

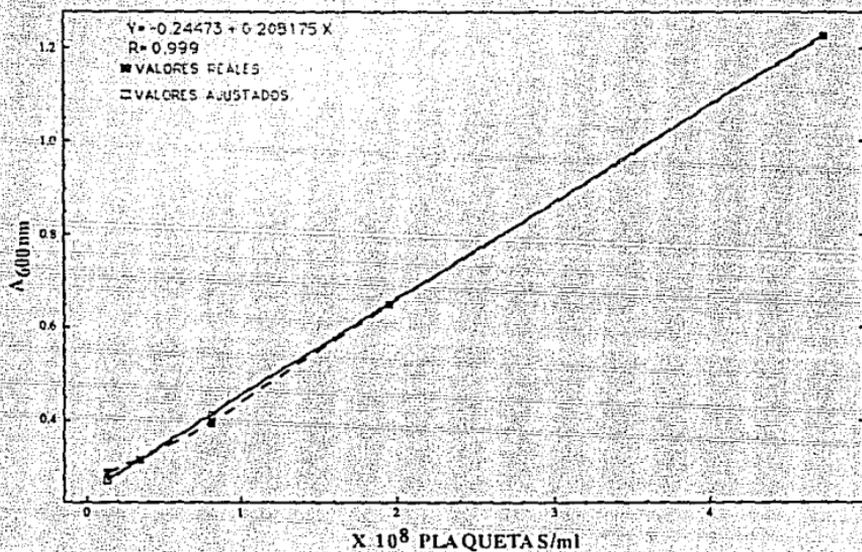
$A_{m_{t_n}}$ = absorbancia de la muestra al tiempo deseado y

$A_{m_{t_0}}$ = absorbancia de la muestra al tiempo cero.

5.- CUANTIFICACION DE PLAQUETAS.

Se obtuvo una curva de calibración correlacionando la A_{600nm} con diferentes diluciones de PRP cuya concentración de plaquetas fue medida directamente con un hemalocitómetro por el procedimiento descrito por Brown⁽²²⁾. El método permite correlacionar la concentración de plaquetas entre 1 y $5 \times 10^8/ml$ y la A_{600nm} , como puede verse en la Figura 7. Los resultados que se obtuvieron son consistentes con los ya reportados por Born y Cross⁽²¹⁾.

Fig. 7: CURVA ESTANDAR DE CUENTA PLAQUETAS
AJUSTADO CON SALINA



6.- OBTENCION DE UN EXTRACTO DE PAPA CON ACTIVIDAD DE APIRASA.

Se procedió de acuerdo Molnar y Lorand⁽²³⁾ con algunas modificaciones:

- Se extrajo jugo de papa blanca con un extractor de jugos de cocina.
- Se dializó contra KCl 0.1M exhaustivamente.
- Se centrifugó el jugo dializado 1 min. en una microófuga, desechándose el precipitado, el sobrenadante resultante se guardó en tubos eppendorf de 1.5 ml. a -20° C.

7.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE APIRASA

La detección de la actividad de apirasa en la saliva se hizo en la forma siguiente: 1) Se incubaron alícuotas de 70 μ l de ADP 1 mM como sustrato en un buffer que contenía KCl 0.1 M, CaCl_2 1mM y TRIS/HCl 50 mM pH 7.3. 2) Se adicionaron a los tubos con sustrato 70 μ l de las muestras problema, o controles. 3) Se pararon las reacciones a tiempo cero y a los 10, 20, 30 y 60 min. con 140 μ l de ácido tricloroacético al 10%. 4) Se centrifugaron las mezclas de reacción en una micrófuga durante un minuto, tomándose 200 μ l del sobrenadante para la cuantificación de iones fosfato (PO_4^{2-}) por el método de Lane y Walmough⁽²⁴⁾ modificado por nosotros.

El método para la detección de fosfatos permite la detección de un mínimo de 4 nmoles del ión. A continuación se describe el procedimiento: 1) Se adicionó 0.07g de ácido ascórbico por cada 10 ml de acetato de sodio 0.5 M pH 4.5 y 1 ml de heptamolibdato de amonio al 35% (solución A), agitándose vigorosamente con barra magnética durante 5 segundos para ponerse inmediatamente sobre hielo (tomando un color amarillento-verdoso). 2) A 200 μ l de las muestras problema se les adicionó 400 μ l de la solución A, dejándose reposar 10 min sobre hielo. 3) Posteriormente se añadieron 600 μ l de la solución B (2% de arsenito de sodio + 2% de citrato de sodio + 2% de ácido acético glacial). 7) Se agitaron en vortex vigorosamente algunos segundos y luego se incubó en un baño de agua a 37° C durante 5 min para leerse finalmente en un espectrofotómetro a 700nm.

Una unidad de actividad de apirasa se definió como la que libera una nmole de Pi en 60 min de incubación en las condiciones descritas arriba.

8.- DETECCION DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.

En este ensayo nos basamos en Leary et al⁽²⁵⁾ y en el Manual de Worthington⁽²⁶⁾. Se usó 5-bromo,4-cloro, 3-indolilfosfato (BCIP) como sustrato de la enzima, y nitro-azul de tetrazolio (NBT) para revelar el sustrato hidrolizado. Para preparar el sustrato se mezclan 5 mg de NBT y 2.5 mg de BCIP, los que previamente se han disuelto por separado con 50 μ l de dimetilformamida, y se lleva la mezcla a 15 ml con buffer de carbonato de sodio 0.1 M + bicarbonato de Na 0.1 M. + NaCl 0.15 M a un pH de 9.5. El procedimiento fue: 1) Se hicieron diluciones seriadas (2 en 2) de saliva y de los controles respectivos en cajas de poliestireno de 8 X 12 pozos. Como diluyente se utilizó el mismo buffer y quedaron 50 μ l en cada pozo de cada una de las diluciones. 2) Se adicionaron 50 μ l del sustrato y se incubó durante 2 horas a 37° C. 3) Se paró la reacción añadiendo 50 μ l de EDTA 50 mM a cada pozo, y 4) Se leyó la absorbancia a 570 nm.

9.- DETECCION DE ACTIVIDAD DE ACTIVADOR DE PLASMINOGENO.

Se usaron los siguientes reactivos: 1) Fibrinógeno (que contiene plasminógeno pegados naturalmente), se dejaron disolviendo 533 mg de la proteína en 40 ml de Tris/HCl 50 mM pH 7.9 durante toda la noche en refrigeración en un tubo de poliestireno de 50 ml; se removió el fibrinógeno no disuelto por centrifugación =1500 rpm durante 10 min; el sobrenadante se conservó congelado en alícuotas, hasta su uso. 2) Agarosa, se fundieron 2 g en 100 ml del mismo buffer y 2.5 ml de azida de sodio al 2% en baño María. 3) Trombina, se resuspendió un vial con 2,000 unidades NIH en un ml de agua.

Procedimiento: 1) Se tomó una caja de Petri de 15 cm de diámetro, se

lavó muy bien y secó con alcohol. 2) Se llevaron la agarosa fundida al 2% y la solución de fibrinógeno a 42° en un baño de temperatura controlada. 3) Se mezclaron 15 ml de cada uno de los reactivos en un tubo de poliestireno con tapadera, manteniendo la temperatura a 42°C. 4) Se adicionaron 30 µl de trombina, se mezcló muy bien e inmediatamente se vertió la mezcla a la caja Petri, procurando obtener una capa homogénea, sin burbujas. 5) Se dejó solidificar a temperatura ambiente para luego hacer pozos a 1.5 cm de distancia (removiendo el agar por succión con pipeta pasteur). 6) Se aplicaron 10 µl de las muestras problema en los pozos. 7) La reacción se incubó a 37° C durante 8 horas. 8) Se midieron los diámetros de las zonas clarificadas y se calculó el área de lisis. La Figura 8 es un ejemplo de los resultados que se obtienen con esta técnica.

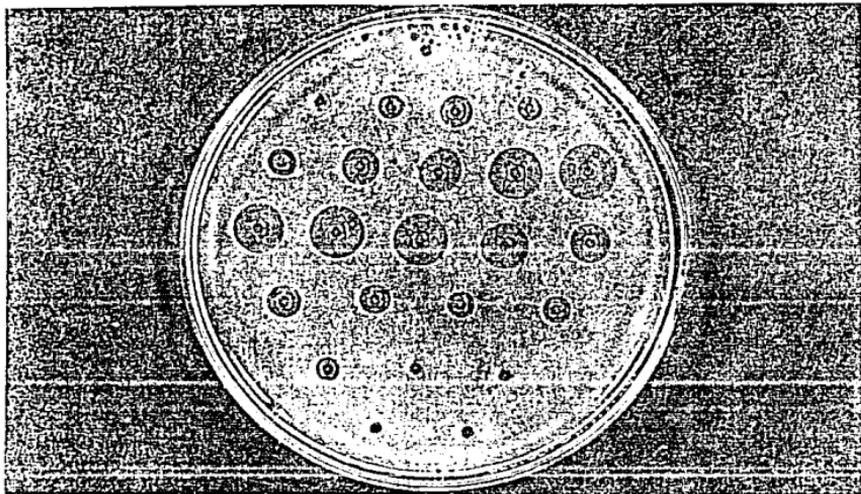


Figura 8. Actividad fibrinolítica indirecta de fracciones del cromatograma de la Figura 19. Cada pocillo contiene 10 μ l de fracciones. La incubación se realizó durante 8 horas a 37° C; son fracciones de 1.5 ml alternadas de la columna Sephadex G-150 a partir de la No. 18 a la No. 60. La reacción positiva se identifica como un halo oscuro en torno a los pocillos.

IV. RESULTADOS

El objetivo fundamental de la presente tesis fue extender las observaciones iniciales de Hawkey⁽⁴⁾ sobre la actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas que tiene la saliva del vampiro *D. rotundus*, y así poder evaluar, si bien preliminarmente, el posible potencial de la(s)

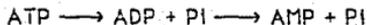
molécula(s) involucrada(s) como fármaco en el tratamiento y/o prevención de padecimientos tromboembólicos.

En particular quisimos responder las siguientes 4 preguntas:

1. La actividad inhibitoria de la saliva del vampiro, ¿depende de actividad de apirasa?
2. De resultar negativa la respuesta de la pregunta anterior, ¿la acción inhibitoria es especifica para la agregación por algún(os) inductor(es) de la agregación plaquetaria?
3. ¿Cuál es el comportamiento de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria en filtración en gel?
4. El componente responsable de la actividad, ¿es de naturaleza proteínica?

1.- La saliva del vampiro no tiene actividad de apirasa.

La saliva de muchos insectos hematófagos tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, además de otros compuestos que actúan a otros niveles, por acción de apirasa⁽²⁾. Las apirasas tienen actividad de adenosina 5'-trifosfatasa y adenosina 5'-difosfatasa, es decir, son fosfatasas específicas de di y trinucleótidos de adenosina, como se observa en las siguientes reacciones:



La actividad de apirasa inhibe la agregación plaquetaria degradando el ADP cuando se utiliza como agonista, así como el ADP que liberan las

plaquetas y que es uno de los responsables de la onda de agregación secundaria. Hawkey⁽⁴⁾, con evidencias indirectas, había ya sugerido que la saliva de *D. rotundus* carece de dicha actividad. En este trabajo se decidió medir directamente la actividad de apirasa en la saliva. Para este efecto se montó un ensayo muy sensible descrito en Procedimientos Experimentales. Los resultados fueron negativos aun utilizando 400 μ g de saliva de vampiro; como controles positivos se utilizaron el extracto de papa y saliva de una chinche hematófaga del género *Triatoma*, los que presentaron una actividad específica de 200 y 7.250 U/mg, respectivamente. Hay que hacer notar que a tiempos de incubación largos la saliva de vampiro presentó cierta actividad extremadamente baja del tipo apirasa, que se puede atribuir a la actividad fosfatásica que, como se muestra en la Figura 9., es importante en la saliva del quiróptero. Hay que resaltar que la saliva de triatomas no presentó esta actividad.



Figura 9. Actividad de fosfatasa alcalina en la saliva de *D. rotundus*. Las filas D y E son diluciones seriadas de saliva de vampiro comenzando con 750 μ g de proteína; F y G= saliva de triatomas comenzando con 400 μ g; H= fosfatasa alcalina comercial de intestino bovino comenzando con 10 μ g.

2. La inhibición de la agregación plaquetaria por la saliva del vampiro ocurre con todos los inductores de agregación probados (ADP, epinefrina, colágena y FAP).

Los experimentos de agregación plaquetaria que se describen en esta sección se realizaron a lo largo de 18 meses y se emplearon diversos donadores de sangre. Dado lo anterior, y a fin de que el lector pueda formarse un criterio sobre la reproducibilidad de los experimentos, decidimos anexas la Tabla 1. En ella, aparece el comportamiento de algunos de los PRP utilizados en base a la absorbancia que presentaron, el número de plaquetas a que correspondía, la absorbancia en el inicio de los experimentos de agregación, el cambio de absorbancia después de 5 min de la inducción de la agregación con ADP (este control estuvo siempre presente en todos los experimentos, independientemente del agonista que se estuviera evaluando), y el porcentaje de agregación plaquetaria al que correspondió dicho cambio de absorbancia. Como puede verse, el rango de concentración de plaquetas varió de 3.1 a 7.5×10^8 plaquetas/ml de PRP y el grado de agregación fluctuó entre 23 y 84%. Este comportamiento es el que normalmente se encuentra en este tipo de experimentos⁽¹³⁾.

Tabla 1. CONCENTRACION DE PLAQUETAS EN EL PRP en base a la muestra núm. 1 y de acuerdo a la Figura 7. El efecto de la A_{600} cuando las plaquetas son estimuladas por ADP 6.25 μ M, (preincubadas 5 min. con el buffer de la saliva) incubándolas con agitación vigorosa 5 min. a 37° C.

FUENTE de PRP	A_{600} Aj. sal.	PLAQUETAS $\times 10^8 / \text{ml}^a$	A_{inicial} Mezcla.	$\Delta c^b = (A_i - A_f)$ A_{600}	% DE AGREG. (Δc en %)
1) F.OI.	1.231	4.72	0.660	-----	-----
2) F.OI.	1.791	7.42	1.406	0.966	69
3) F.OI.	1.629	6.54	1.230	0.767	62
4) F.OI.	1.610	6.55	1.190	0.737	63
5) F.OI.	1.635	6.67	1.145	0.260	23
6) E.A.	1.090	4.06	0.660	0.170	33
7) E.A.	1.573	6.37	1.060	0.498	47
8) D.C.	1.610	6.55	1.190	0.360	27
9) D.C.	1.335	5.23	1.000	0.700	54
10) D.C.	1.720	7.08	1.320	0.959	73
11) D.C.	1.260	4.67	1.010	0.639	63
12) F.Or.	0.597	3.10	0.390	0.167	43
13) F.Or.	1.545	6.24	1.107	0.762	69
14) J.V.	1.710	7.03	1.260	0.690	55
15) J.V.	1.663	6.81	1.342	0.509	38
16) J.V.	1.800	7.46	1.370	0.520	38
17) A.O.	1.490	5.93	1.160	0.771	67
18) A.O.	1.540	6.22	1.200	0.940	76
19) A.O.	1.308	5.10	1.050	0.830	79
20) A.O.	1.520	6.12	1.170	0.598	51
21) A.O.	1.600	6.50	1.202	0.511	42
22) A.O.	1.657	6.83	1.270	0.537	42
23) A.O.	1.623	6.61	1.012	0.341	34
24) E.R.	1.730	7.13	1.340	0.916	68
25) E.R.	1.045	3.84	0.722	0.212	29
26) E.R.	1.572	6.37	1.149	0.426	37
27) M.L.E.	1.760	7.27	1.239	0.732	59
28) S.V.	1.685	6.91	1.221	0.868	71
29) S.V.	1.524	6.14	1.158	0.920	70
30) S.R.	1.765	7.30	1.386	1.159	84
31) S.R.	1.730	7.13	1.181	0.655	56
32) D.O.	1.800	7.46	1.194	0.755	63
33) R.H.	1.419	5.64	0.988	0.410	41
34) A.R.	1.792	7.43	1.241	0.827	67
35) E.M.T.	1.744	7.19	1.261	0.907	72

a: Calculado en base a la muestra 1, en donde las plaquetas fueron contadas en hematocitómetro.

b: Δc es la diferencia de las absorbancias a 600 nm inicial y después de 5 min (final).

Aj. sal. = ajustado con salina (NaCl 154 mM, pH 7.4)

La estrategia seguida para determinar la inhibición por saliva de la agregación plaquetaria inducida por diferentes agonistas fue:

1. La obtención de curvas dosis respuesta de agregación con cada uno de los inductores de agregación usados, a fin de precisar las concentraciones de los mismos que serían usados para los estudios de inhibición. La concentración de los agonistas se decidió en base a que no fuese máxima y a que el efecto fuese medido con la mayor sensibilidad posible; estas dos condiciones se cumplen, en términos generales, a la dosis que induce la agregación entre un 40 y 80%.

2. Una vez seleccionada la concentración del inductor en turno, se procedió a cuantificar el efecto inhibitorio con diferentes concentraciones de saliva.

La curva dosis-respuesta para el ADP como inductor de la agregación aparece en la Figura 10. El comportamiento de la curva fue muy similar a lo reportado por otros (13). Se decidió emplear $6.25 \mu\text{M}$ para inducir la agregación, ya que en estas condiciones se induce una agregación plaquetaria de $61.5 \pm 12.6\%$. A fin de mostrar el tipo de registros obtenidos en este tipo de estudios, se presentan los resultados de un experimento de agregación inducida por distintas concentraciones de ADP (Figura 11); hay que hacer notar que en este caso particular se hizo un seguimiento de la agregación sólo durante 2.5 minutos.

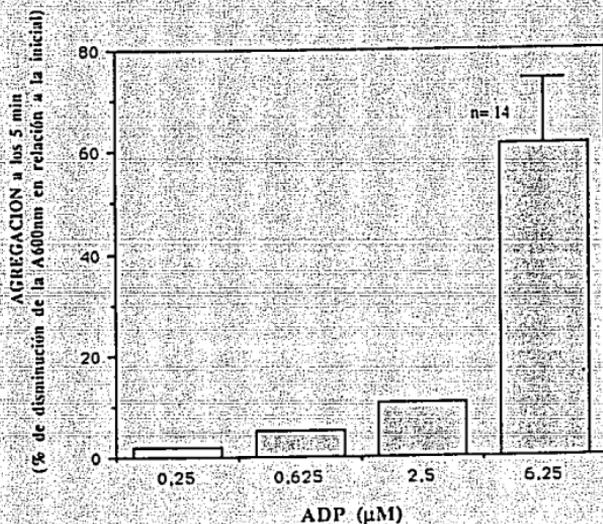


Figura.10. Agregación plaquetaria inducida por ADP. La agregación plaquetaria expresada en porciento de la disminución de la A_{600nm} inicial (tiempo= cero) a la cual se le asigna un valor de 100, se calculó a los 5 min. de haber adicionado el inductor de la agregación (ADP). A bajas concentraciones de ADP (0.25, 0.625 y 2.5 μM) solo se obtuvo un valor experimental; a una concentración superior (6.25 μM) se da el promedio y la desviación estándar de 14 determinaciones independientes.

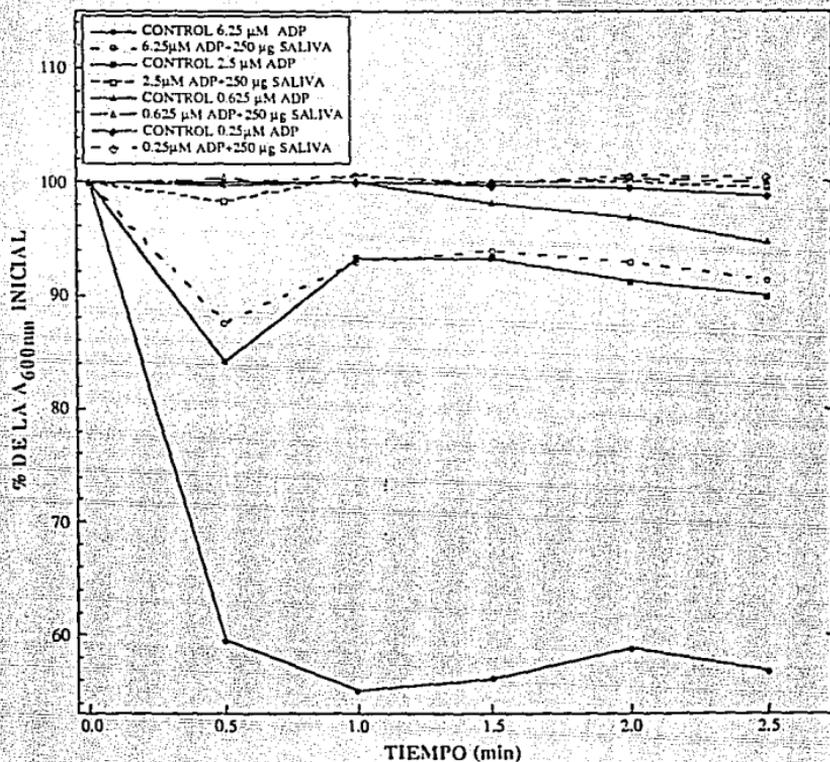


Figura 11. Cinética de la agregación plaquetaria inducida por ADP. Se leyó la absorbancia cada 30 segundos desde que se adicionó el ADP, durante 2.5 min. Las líneas continuas con símbolos cerrados indican el cambio en el porcentaje de absorbancia respecto de la inicial correspondiente a las diferentes concentraciones de ADP, desde 0.25 hasta 6.25 μ M.

La Figura 12 es la gráfica dosis-respuesta de la inhibición de la agregación plaquetaria por la saliva, variando la concentración de esta última, como puede apreciarse, se obtuvo una inhibición del 50% entre 250 y 500 μg por ensayo, es decir, a una concentración de 625 a 1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

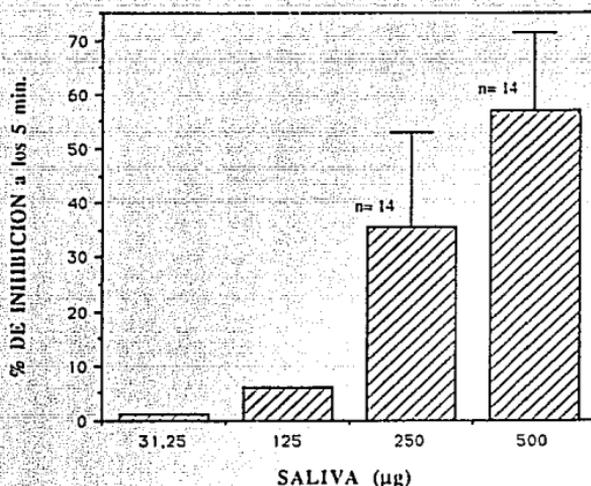


Figura 12. Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP con diferentes cantidades de saliva. La inhibición se calculó a los 5 min después de la adición del inductor (ADP 6.25 μM). Para las cantidades bajas de saliva (31.25 y 125 μg) solo se obtuvo un valor experimental; en las altas (250 y 500 μg) se da el promedio y la desviación estándar de 14 determinaciones independientes.

La agregación inducida por diferentes concentraciones de epinefrina (2.5, 5 y 10 μM) se muestra en la Figura 13. Si bien no se obtuvo una buena curva dosis-respuesta, se decidió la concentración de 2.5 μM , donde ocurrió un $66 \pm 19.2\%$ de agregación a los 5 min, que también está en el rango de las dosis de epinefrina usadas por otros (13). La Figura 14 muestra los resultados de inhibición con la saliva del vampiro. Es interesante hacer notar, que el máximo de inhibición ocurrió a los 2 min y que a los 5, hubo una recuperación significativa de la acción inhibitoria; así con 250 μg de saliva la inhibición de la agregación fue de 43.5 y 21.2% a los 2 y 5 min, respectivamente. Este fenómeno es frecuente que ocurra cuando se usa epinefrina como agonista(13), especialmente a bajas concentraciones relativas, como fue nuestro caso.

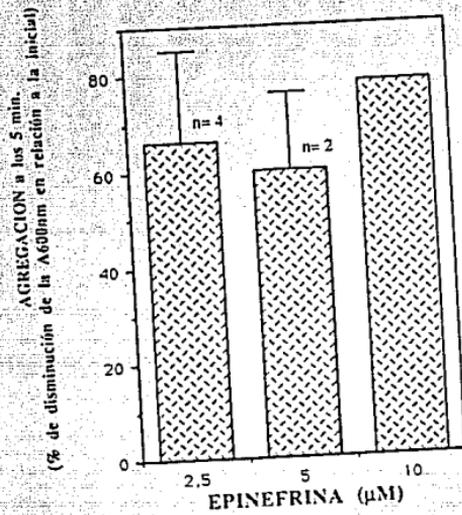


Figura 13. Agregación plaquetaria inducida por epinefrina..La agregación se calculó como en la figura 9.

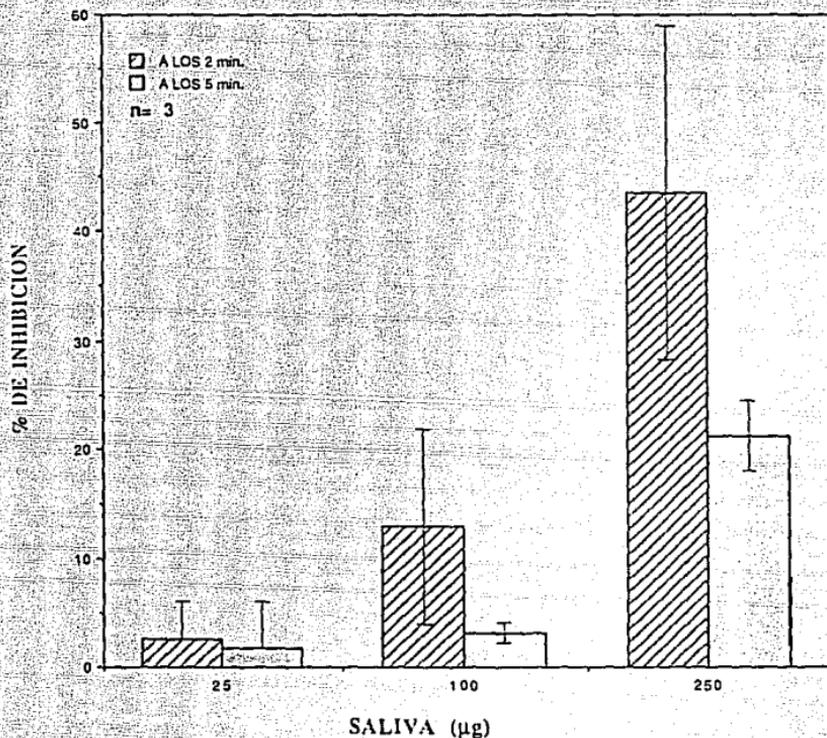


Figura 14. Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina por diferentes cantidades de saliva. La inhibición se calculó a los 2 y 5 minutos después de adicionar el inductor de la agregación (epinefrina $2.5 \mu\text{M}$), notándose un efecto mayor a los 2 min que a los 5 min. En todos los casos se expresa el promedio y la desviación estándar de 3 determinaciones independientes.

Cuando la inducción de la agregación plaquetaria se hizo con colágena de cola de rata (soluble en ácido) a diferentes concentraciones (1.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$) se logró una buena curva dosis-respuesta (Figura 15); en este caso, la colágena primero se diluyó en ácido acético glacial 0.1 M para dar un stock de 1mg/ml para posteriormente llevarse a las concentraciones deseadas con salina. Se escogió la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de colágena ($40.2 \pm 12.8\%$), que coincidió con la que normalmente se emplea⁽¹³⁾. La curva de inhibición (Figura 16) se presenta de dos maneras, la primera de acuerdo a una curva de inhibición convencional y, la segunda, mostrando los resultados reales en relación al tiempo. Nótese que con este agonista la respuesta de agregación es mucho más lenta y menos pronunciada que lo que ocurre con ADP. Con colágena, la dosis inhibitoria media se alcanza entre 250 y 500 μg de proteína salival.

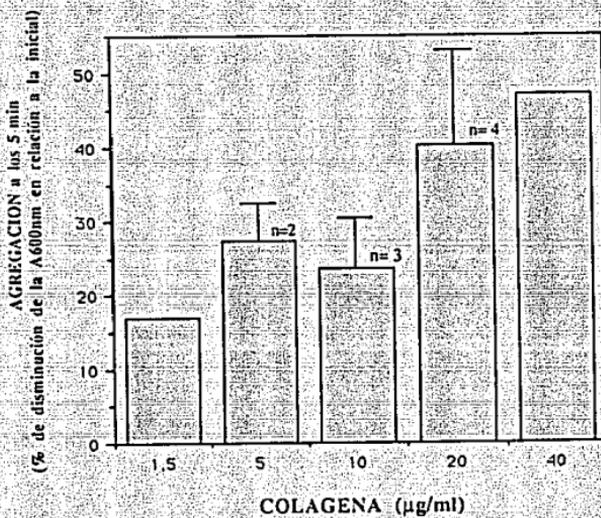


Figura 15 .Agregación plaquetaria inducida por colágena.

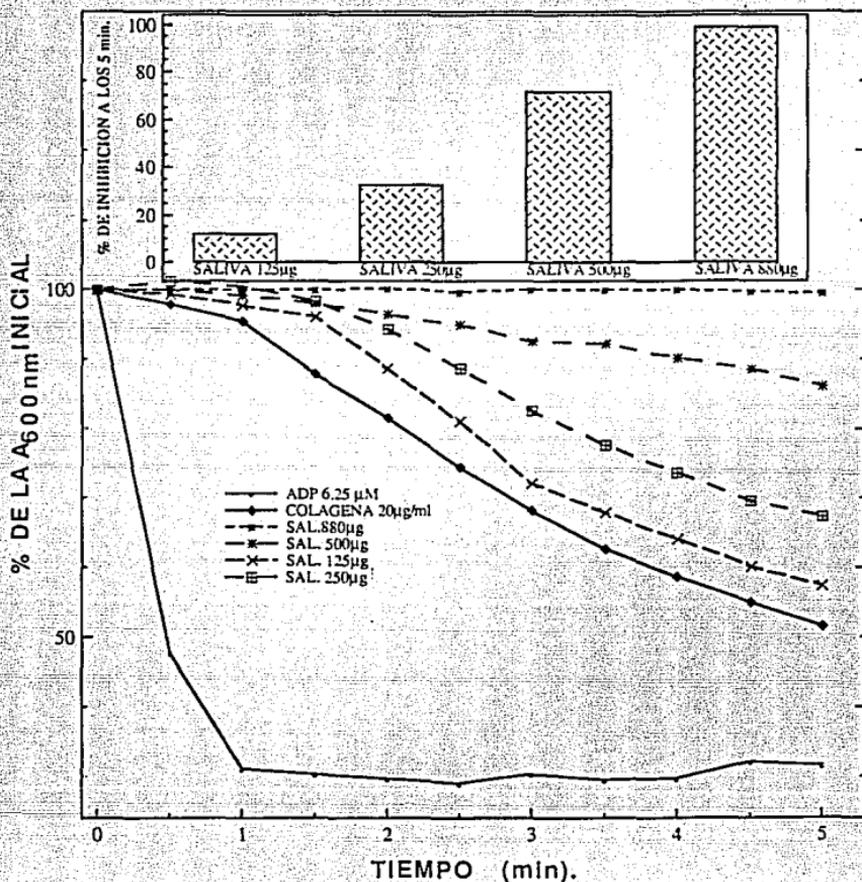


Figura 16. Inhibición de la agregación inducida por colágena con diferentes cantidades de saliva. El agonista se usó a 20 µg/ml (concentración en volumen final). En todos estos casos se obtuvo solo un valor experimental. En el panel de arriba los resultados se expresan como inhibición contra cantidad de saliva. El de abajo, muestra los resultados en relación a la absorbancia inicial a fin de que pueda compararse la cinética de agregación inducida por colágena y por ADP.

Para las curvas con el FAP (factor activador de plaquetas) se procedió a secarlo en atmósfera de nitrógeno, ya que viene en cloroformo, y se diluyó a la concentración deseada en salina con 0.2 % de albúmina sérica bovina; en estas condiciones el FAP guarda su potencia hasta 2 h después de su preparación. Asimismo, la capacidad de respuesta de las plaquetas a este inductor es muy sensible al tiempo transcurrido desde su obtención, ya que su reactividad disminuye profundamente con el tiempo transcurrido después de la extracción de la sangre; por ello, nos limitamos a utilizar plaquetas con menos de 130 min de preparadas. La Figura 17 muestra la curva dosis-respuesta de la agregación de plaquetas con concentraciones variables del inductor; se seleccionó la concentración de 0.555 μ M, que indujo una respuesta de $59.4 \pm 10.4\%$. La dosis inhibitoria de la saliva, una vez más, cayó entre 250 y 500 μ g de saliva (Figura 18).

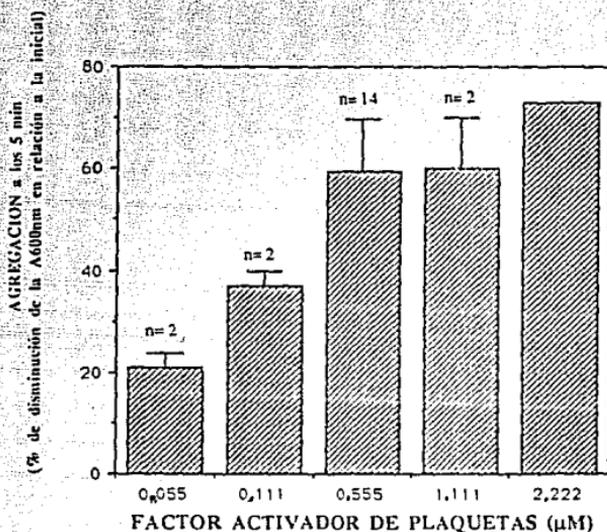


Figura 17. Agregación plaquetaria inducida por FAP. La agregación se calculó como en la Figura 13. Los resultados se expresan como promedio y desviación estándar del número de experimentos indicado.

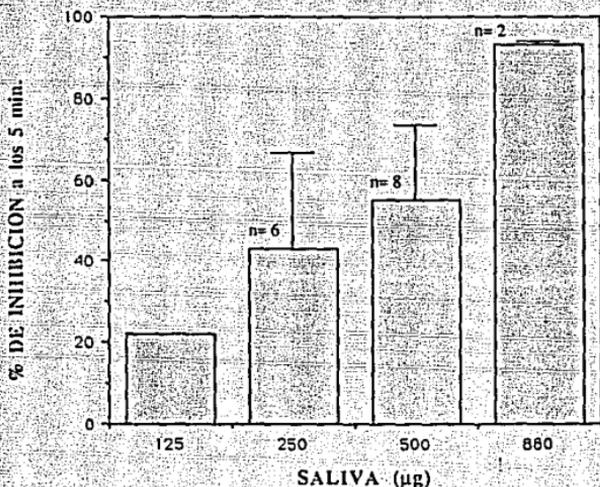


Figura 18. Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por FAP con diferentes cantidades de saliva.. La inhibición se calculó después de 5 min de la adición del inductor de la agregación (FAP 0.555 μ M). Las demás indicaciones son iguales a las gráficas anteriores.

En resumen, la saliva del vampiro *D. rotundus* es capaz de inhibir la agregación de plaquetas humanas independientemente del agonista empleado y con la misma potencia en todos los casos.

3. La actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria no puede detectarse con claridad después de fraccionar la saliva por cromatografía de exclusión molecular, pero sí otras de sus actividades biológicas (activación de plasminógeno y fosfatasa alcalina).

A fin de comenzar el fraccionamiento de la actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas, así como de evaluar la posible presencia de varias especies moleculares con dicha actividad en la saliva del vampiro, se realizó cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-150 en la que también se determinaron actividad fibrinolítica indirecta (por activación de plasminógeno) y de fosfatasa alcalina.

Los resultados del fraccionamiento de una de las corridas cromatográficas realizadas se muestra en la Figura 19. En ella se muestran los resultados de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida con ADP. Se observa que no se logró detectar con precisión la actividad inhibitoria, si bien se nota que en la región que eluye entre el inhibidor de tripsina y el NaCl pudiera estar localizada la actividad. Hay que resaltar que las determinaciones se hicieron en varios días y con plaquetas provenientes de cuatro donadores diferentes, ya que metodológicamente estábamos restringidos en el número de ensayos que podían ser llevados a cabo en una única sesión de 5 horas. La misma tendencia se notó en un total de 4 experimentos independientes tanto con saliva de vampiro recién colectada como con saliva liofilizada y reconstituida. En un quinto experimento (Figura 20), se juntaron los tubos de las regiones indicadas y se les determinó la

actividad biológica en una misma sesión y con las plaquetas de un mismo donador que se sabían respondían bien. De nuevo los resultados no fueron concluyentes; de hecho hay que resaltar que la fracción 4, en donde se notó previamente que pudiese estar localizada la actividad inhibitora, se comportó como las otras, es decir, tuvo una actividad muy baja no significativa.

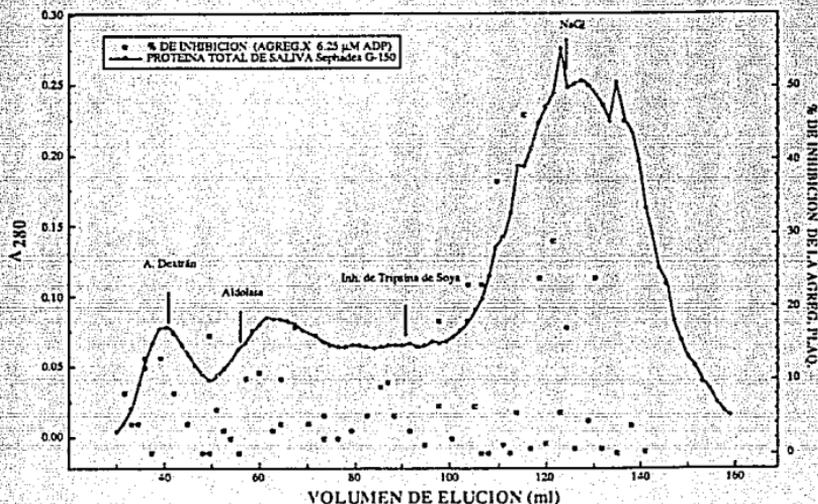


Figura 19. Filtración en una columna de Sephadex G-150 de saliva de vampiro. Se aplicaron 14 mg de saliva extraída con estimulación de pilocarpina intraperitoneal. La columna (0.9 X 190 cm; 121 ml de lecho) fue corrida a temperatura ambiente con buffer de Tris/HCl 0.150 M a pH 7.3, a un velocidad de 15 ml/h, y se recogieron fracciones de 1.5 ml. A las muestras se les determinó su A_{280nm} , así como su efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP 6.25 μ M.

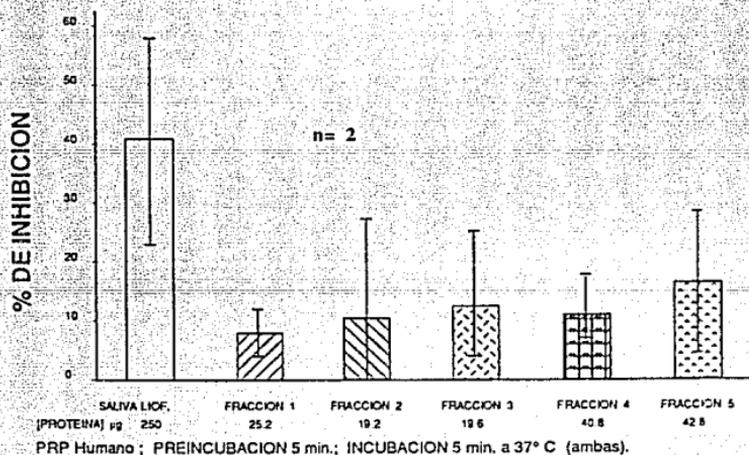
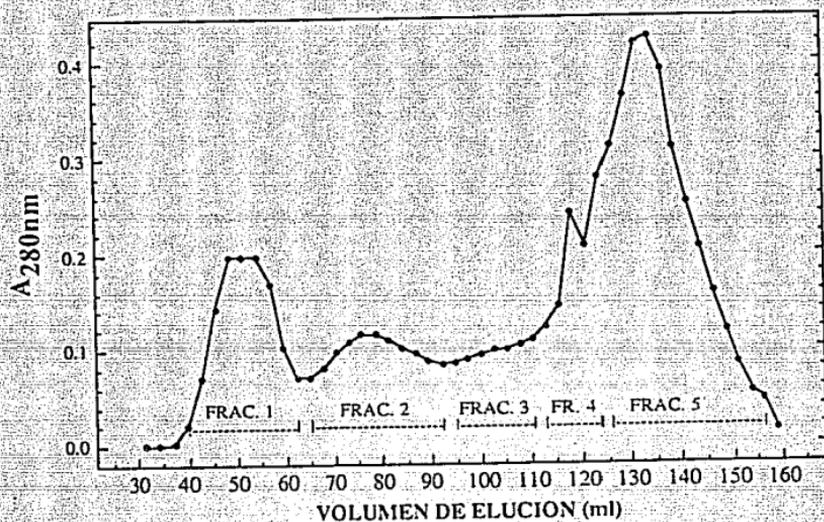


Figura 20 (de la página anterior). Filtración en gel de saliva liofilizada y actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de las fracciones obtenidas. Las condiciones fueron iguales a las de la Figura 19, excepto que la muestra fue saliva liofilizada y reconstituída (21.3 mg).

También seguimos en los cromatogramas las actividades de fosfalasa alcalina y de activador de plasminógeno como se ve en las Figuras 21 y 22. La primera actividad eluye en una posición que indica un peso molecular muy alto, estando el máximo de su actividad entre el azul de dextrán y la aldólasa (158,000 daltones). El activador de plasminógeno aparece como un pico relativamente ancho entre la aldolasa y el inhibidor de de tripsina (20,100 daltones); de hecho, éste es su comportamiento normal.

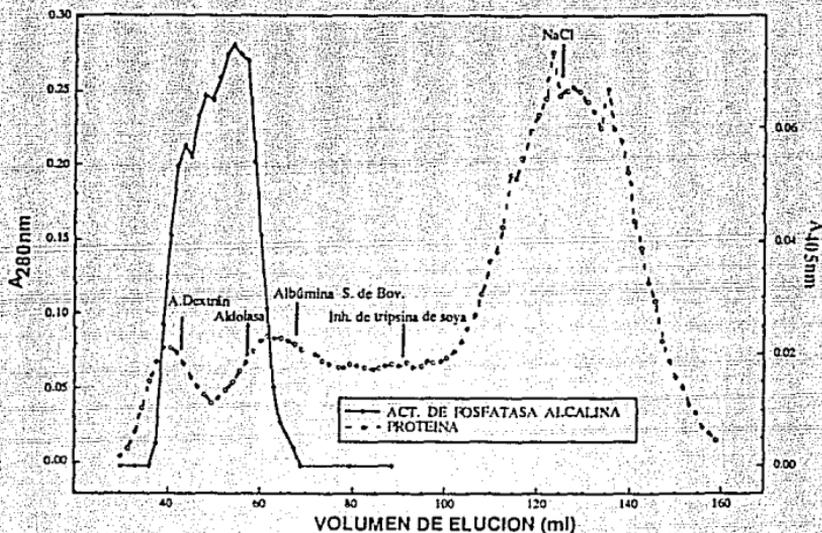


Figura 21. Actividad de fosfatasa alcalina en las fracciones obtenidas después de cromatografiar saliva de vampiro en Sephadex G-150. El cromatograma es el mismo que el de la Figura 19.

Con el objeto de ilustrar la separación alcanzada en las columnas de filtración en gel se agrega la Figura 23, en donde se muestran los patrones electroforéticos de un buen número de las fracciones obtenidas, así como el patrón de bandas de la saliva y de un extracto de glándula salival (parótidia principal). Nótese que la saliva es más bien compleja, con alrededor de 13 a 15 componentes conspicuos. Pero se pueden observar en los carriles 3, 4, 5, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 bandas bien definidas, que corresponden a la actividad de fosfatasa alcalina, de

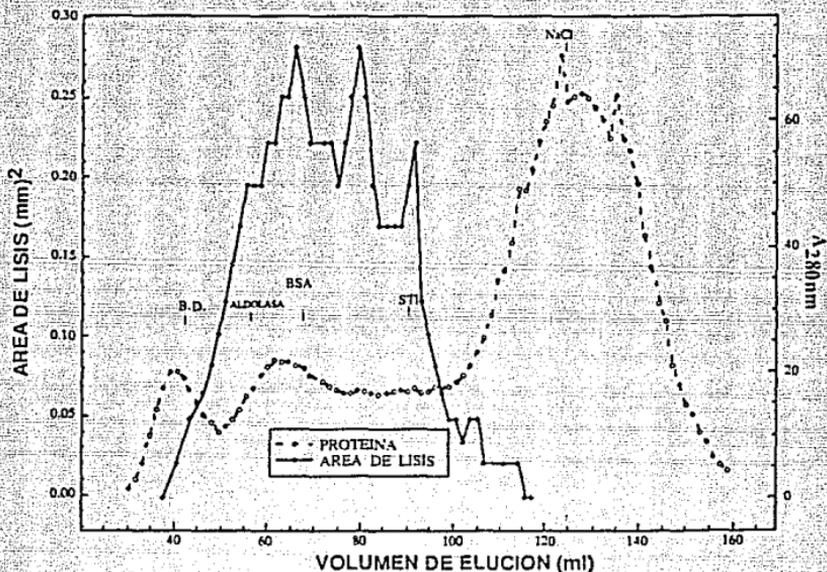


Figura 22. Detección de activador de plasminógeno en el cromatograma de saliva en Sephadex G-150. El experimento es el mismo que el que aparece en la Figura 19.

un peso molecular mayor a 60 Kda y otras menos nítidas de alrededor de 30 y 15 Kda respectivamente. En esta misma figura, las bandas correspondientes al activador de plasminógeno se ubican entre el volumen de elución de 45 a 95 ml, es decir abarcando los carriles desde el 12 al 26, notándose dos bandas a partir del volumen de elución de 62 ml al de 84 ml, aproximadamente 17 y 13 Kda respectivamente, y otra banda de alrededor de 30 Kda.

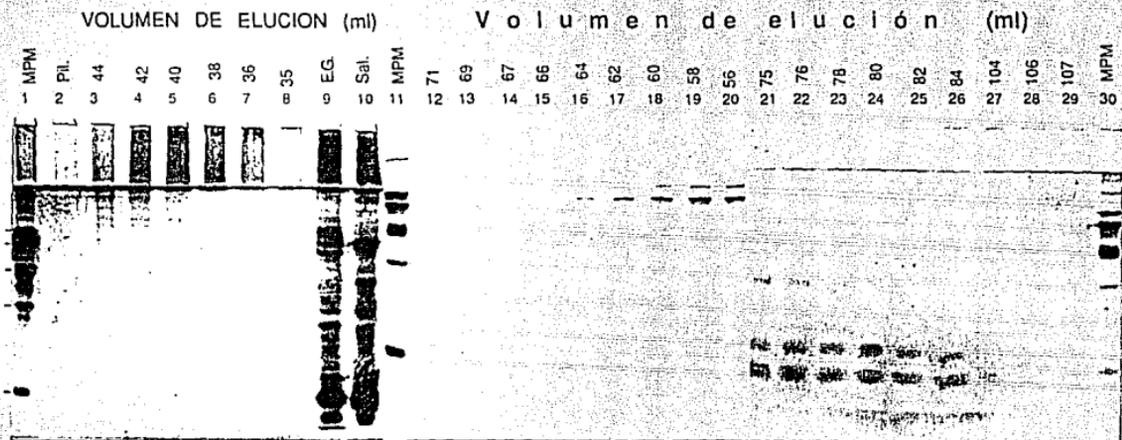


Figura 23. Patrones electroforéticos de las fracciones obtenidas después de la filtración en gel Sephadex G-150.

Se trata de geles de poliacrilamida (12.5 %) con SDS. Los carriles están numerados horizontalmente y el volumen de elución del tubo correspondiente aparece en forma vertical, así como las claves de las otras muestras, que son: MPM = marcadores de peso molecular, que corresponden, de arriba hacia abajo a 80, 67, 43, 30 y 15 Kda; Pil. = pilocarpina al 0.4%; E.G. = extracto glandular; Sal.= saliva. En todos los casos se aplicaron 10 µl de muestra. De la saliva y el extracto se aplicaron 8-10 µg de proteína.

Es interesante mencionar que Hawkey⁽⁴⁾ en 1967, realizó también filtración en Sephadex G-200 de saliva de vampiro, y si bien no mostró la calibración de la columna ni el patrón de proteína, este autor sí pudo detectar, aparentemente con claridad, la actividad inhibitoria al término de la corrida así como la de activador de plasminógeno; encontró la actividad inhibitoria desplazada hacia la derecha del activador de plasminógeno. Lo que nosotros encontramos, como ya se mencionó algunos párrafos arriba, fue sólo indicios no concluyentes de que la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria tiene un peso molecular menor que el activador de plasminógeno, conclusión que concuerda con la del autor mencionado.

4.- El componente inhibitor parece ser de naturaleza proteica.

A fin de acercarnos a la posible naturaleza química del factor inhibitorio de la agregación plaquetaria presente en la saliva de *D. rotundus*, diseñamos la serie de experimentos que abajo se detallan. En particular quisimos saber si era dializable, sujeto a desnaturalización térmica, precipitable por ácido tricloroacético, y si podía ser digerido por tripsina.

Cuando dializamos la saliva en membranas de corte 3.5 Kda y 7 Kda, contra amortiguador isotónico de Tyrode modificado (libre de Ca^{++} y de Mg^{++}), removiendo el amortiguador en 3 ocasiones durante tres horas consecutivas, bajo agitación y a $-4^{\circ}C$, y luego durante toda la noche, el factor de la saliva responsable de la inhibición de la agregación inducida por ADP ($6.25 \mu M$) no se perdió (Figura 24).

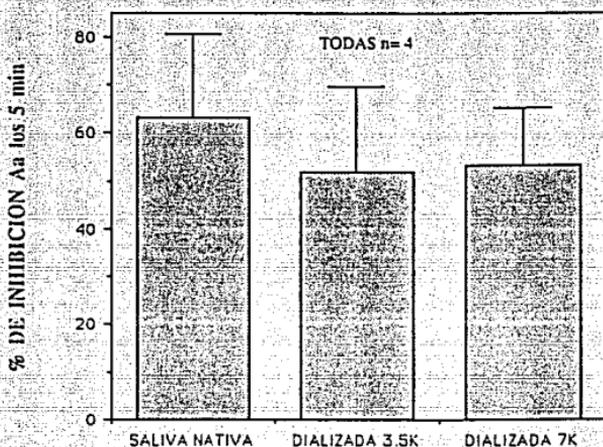


Figura 24. Inhibición de la agregación plaquetaria por saliva de vampiro dializada. En cada caso se utilizaron equivalentes volumétricos a 500 μ g de proteína de la saliva nativa; la inducción de la agregación plaquetaria se hizo con 6.25 μ M de ADP.

Para los experimentos con desnaturalización por calor se procedió a calentar a ebullición a baño María, durante 15 min, saliva de vampiro a 0.625 mg/ml en buffer Tyrode modificado. No se observó formación de material insoluble al término del tratamiento. Las muestras así tratadas conservaron intacta su actividad inhibitora de la agregación plaquetaria (Figura 25).

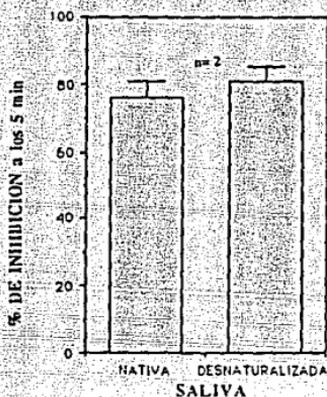


Figura 25. Inhibición de la agregación plaquetaria por saliva nativa y saliva desnaturalizada por calor. Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de 2 experimentos. En todos ellos se valoraron 500 μ g de proteína salival y la inducción de la agregación fue hecha con 6.25 μ M ADP.

Por otra parte, se trató 1 ml de saliva (5.2 mg/ml) con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 5 %, durante 10 min; el precipitado formado fue removido por centrifugación (1 min, en microfuga) y el sobrenadante fue dializado exhaustivamente contra solución de Tyrode a 4°C en una membrana con corte de 7 kDa. Como control, se procesó la misma cantidad de BSA bajo las mismas condiciones. Tanto el sobrenadante de la saliva como el de la BSA, no presentaron actividad inhibitoria, lo cual indica que el factor responsable de la actividad es precipitable por TCA. Es importante recalcar que en esta serie de experimentos se tomaron las

precauciones necesarias a fin de que las muestras de saliva precipitada fueran equivalentes, en volumen ensayo, a 500 μ g de proteína de saliva, cantidad con la que se observa muy claramente el efecto inhibitorio.

La digestión de la saliva con tripsina 5:1 (p/p) durante 30 min a 37°C (cuya reacción fue parada con una cantidad equimolar de inhibidor de tripsina de soya) redujo alrededor de 60% la actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas en relación a la saliva nativa (Figura 26); de hecho esta reducción no fue mayor aun después de 90 min de digestión. En este experimento, también se incluyó la digestión de BSA en las mismas condiciones a fin de evaluar posibles interferencias o impactos de la tripsina y de su inhibidor. Las muestras de saliva y BSA digeridas también fueron analizadas mediante electroforesis en gels de poliacrilamida. En la Figura 27 puede notarse que hubo una digestión parcial de ambas muestras, aun a 90 min de digestión, con la aparición de componentes de menor peso molecular y la disminución en la cantidad de masa de muchas de las bandas. Obsérvese la banda de alrededor de 40 Kda. que aparece en el carril 5 de la figura 27 en donde la saliva es digerida con tripsina durante 90 minutos, esta banda no es observada cuando las digestiones, en las mismas condiciones, son a los 30 minutos.

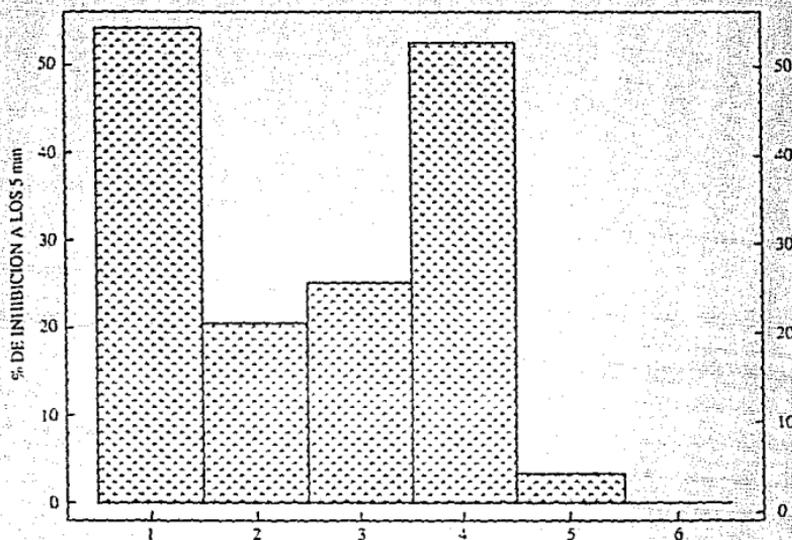


Figura 26. Inhibición de la agregación plaquetaria con las muestras digeridas con tripsina. La agregación fue inducida con ADP ($6.25 \mu\text{M}$) y los ensayos de inhibición se evaluaron con $500 \mu\text{g}$ de proteína de las muestras respectivas. 1= saliva sin digerir; 2= saliva digerida 30 min; 3= saliva digerida 90 min; 4= saliva control incubada (90 min) en las mismas condiciones; 5= BSA digerida 30 min; 6= BSA digerida 90 min.

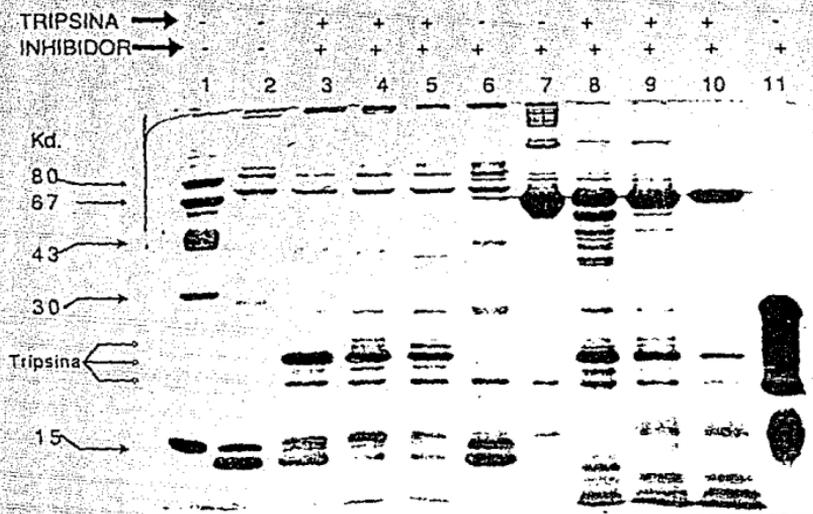


Figura 27. Análisis electroforético de las fracciones digeridas con tripsina. Los gels de poliacrilamida (12.5%) se corrieron en presencia de SDS. Todas las muestras que contenían tripsina fueron tratadas con 1% (v/v) diisopropilfluorofosfato, a fin de evitar degradación proteolítica durante la electroforesis. El carril 1 y 11 corresponden a marcadores de peso molecular y a inhibidor de tripsina de soja, respectivamente. En los carriles 2 a 6 se analizaron muestras de saliva: 2= saliva fresca; 3= saliva con tripsina sin incubación; 4= saliva con tripsina digerida 30 min; 5= saliva con tripsina digerida 90 min, 6= saliva sin tripsina con HCl 1 mM incubada 90 min. En los carriles 7 a 10 se analizaron muestras de albúmina sérica bovina (BSA): 7= BSA con HCl 1mM incubada 90 min.; 8= BSA con tripsina sin incubación; 9= BSA digerida con tripsina 30 min, y 10= BSA con tripsina digerida 90 min.

En todos los carriles se aplicaron 25 μ g de proteína de la muestra correspondiente. Las preparaciones que fueron digeridas contienen 5 μ g de tripsina y 5 μ g de inhibidor de tripsina de soja y las de los carriles 6 y 7 sólo éste último. En el carril 11 se aplicaron 50 μ g de proteína.

En resumen, la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de la saliva del vampiro no atraviesa membranas semipermeables con cortes de 3.5 o 7 Kda, es termoresistente, es precipitable con TCA y es sensible a la acción de tripsina.

V. DISCUSION

Hemos corroborado que en la saliva del vampiro no se encuentra actividad de apirasa, a través de dos ensayos diferentes e independientes; por un lado en los ensayos de inhibición de la agregación, cuando se preincubó el ADP con la saliva a 37°C durante 5 a 10 min con agitación lenta y posteriormente al adicionarle el PRP e incubándola con agitación vigorosa durante 5 a 7 min a la misma temperatura anterior, la saliva continuó siendo activa; este es un resultado semejante al obtenido por Hawkey⁽⁴⁾. Por otra parte, midiendo directamente la actividad de apirasa comparándola con apirasa de papa blanca y con la apirasa presente en la saliva de triatómidos mexicanos; en la saliva del vampiro la actividad fué extremadamente baja, de hecho la liberación de fosfatos que se observó podría ser debido a la actividad de fosfatasa alcalina que se encuentra en la saliva.

Los resultados que hemos obtenido sugieren que la saliva de vampiro inhibe la agregación de plaquetas humanas en un punto común de al menos cuatro agonistas (ADP, colágeno, FAP y epinefrina); ya sabemos que la agregación por un quinto, trombina, también es inhibida⁽⁴⁾. Estos agonistas siguen rutas distintas para causar la agregación plaquetaria (Figura 6). El

hecho de que se obtuvieron curvas dosis-respuesta, variando la cantidad de saliva, semejantes con los diferentes agonistas apoya la hipótesis de que la acción de la saliva es sobre una ruta común inhibitoria y no una antagónica a un receptor específico como el mecanismo responsable de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria. Lo anterior indicaría, de acuerdo al modelo hidráulico propuesto por Vargaftig et al (17) que la acción inhibitoria de la saliva pudiera ser inhibiendo la actividad de la fosfolipasa A_2 (FLA₂), es decir, una acción semejante al p-bromofenacil bromuro, mepacrina e indometacina (todos ellos inhibidores de la FLA₂). Sin embargo, experimentos hechos por Javier Vargas en nuestro laboratorio, demuestran que la saliva del vampiro no inhibe la actividad enzimática de la fosfolipasa A_2 de *Heloderma noricum horridum* ni las enzimas fosfolipásicas membranales de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, hallazgos que no descartan, pero hacen poco probable, que la saliva esté inhibiendo la fosfolipasa A_2 de las plaquetas humanas.

Otro posible nivel de acción sería que la saliva tuviera una acción inhibitoria de la fosfolipasa C, tal vez interfiriendo con las proteínas G, evitando así las dos rutas secretorias de las plaquetas humanas, descritas en la Figura 5, y que conducen a una agregación plaquetaria irreversible.

Se sabe que la mayoría de las respuestas de agregación plaquetaria dependen más de los productos vía ciclooxigenasa (Figs. 5 y 6), por lo que otro punto de inhibición común podría ser dicha enzima, que es el blanco de la aspirina.

Otra posibilidad sería que la saliva de vampiro tuviera compuestos capaces de atravesar la membrana de las plaquetas y que inactivaran las cinasas que fosforilan proteínas, las cuales, una vez fosforiladas activan la respuesta secretoria de las plaquetas⁽¹⁵⁾; o que actuara sobre el complejo

Ca^{2+} -calmodulina que activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina, misma que está asociada con los primeros cambios conformacionales precedentes a la secreción, pero creemos que no es el caso porque estas vías de secreción son más bien específicas y la respuesta a la inhibición de la agregación por la saliva es común a varios inductores.

Otro mecanismo común de inhibición podría ser la interferencia en el pegado de fibrinógeno al complejo glucoproteico (GP) IIb/IIIa de las membranas plaquetarias con lo que se evitaría la formación de puentes intraplaquetarios de fibrinógeno en la agregación; es decir, que la saliva tuviera un componente con acción similar a la ticlopidina⁽⁷⁾. De hecho, recientemente se han obtenido anticuerpos monoclonales contra el complejo GP IIb/IIIa que interfirieron la agregación^(27 y 28). Semejante efecto inhibitorio se logró con el pentapéptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, que compite con el fibrinógeno por el pegado al complejo GP IIb/IIIa de las plaquetas⁽²⁹⁻³¹⁾.

Se ha observado que las plaquetas cargadas de aequorina indican una elevación en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a los agonistas comunes como epinefrina, ADP, colágena, trombina, prostaglandinas H_2 , análogos a U44619, ionóforo de calcio A_{23187} , ácido araquidónico y ésteres de forbol⁽³²⁾. El Ca^{2+} intracelular participa en varios niveles de la respuesta agregatoria de las plaquetas y proviene, en condiciones de estimulación, del Ca^{2+} del medio extracelular y de la movilización del Ca^{2+} intracelular. Así otra posibilidad sería la interferencia por parte de la saliva en los canales del ion calcio de las plaquetas, evitando su entrada, o bien, interfiriendo en la disponibilidad del Ca^{2+} de la poza interna.

También puede suponerse que la saliva de vampiro tenga compuestos que activen la adenil ciclasa o que inhiban la fosfodiesterasa del AMPc, elevando la concentración interna del AMPc en las plaquetas. Es decir que actúen en una forma semejante a la prostaciclina (PGI₂) que activa la adenilato ciclasa ó el caso del 3-isobutil-1- metilxantina que inhibe la fosfodiesterasa⁽³³⁾, incrementando los niveles intracelulares de AMPc, los cuales inhiben a la FLA₂, la fosfolipasa C (FLC), y al inositol 1,4,5 trifosfato⁽¹⁵⁾. El iloprost y el forskolin, que incrementan los niveles de AMPc en las plaquetas, también inhiben la activación de las mismas⁽³⁴⁾.

Por otra parte, pudiera ser que en la saliva de vampiro existan quelantes de hierro como la desferroxamina ó el 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona que sean los responsables de la inhibición de la agregación plaquetaria, porque estos compuestos inhiben la agregación de las plaquetas cuando son estimuladas con ADP, adrenalina y colágena⁽³⁵⁾, a través de la remoción del hierro asociado a la ciclooxigenasa.

También desconocemos si la saliva tenga una sustancia que sea semejante a la erbstatina, la cual bloquea la fosforilación de las proteínas, la hidrólisis de los polifosoinositoles, la activación de la PKC, la secreción de la serotonina y la agregación de las plaquetas cuando es inducida por FAP⁽³⁶⁾.

A diferencia de Hawkey⁽⁴⁾, no pudimos seguir la actividad inhibitoria después del fraccionamiento cromatográfico de la saliva. Como puede observarse en la Figura 19, se ensayaron 200 µl de cada una de las fracciones colectadas. Si asumimos un factor de dilución de 10 veces y que a la columna se aplicaron alrededor de 15 mg, podemos concluir que las concentraciones de

las fracciones fué suficiente para haber detectado la actividad inhibitoria. Esto sugiere que probablemente haya una acción potenciadora de algún componente con un peso molecular diferente del principio activo responsable de la inhibición de la agregación plaquetaria.

No creemos que el decremento de actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria observado en las fracciones de la saliva en la columna de filtración en gel (Figuras 19 y 20) se deba a la desnaturalización térmica de tal principio a temperatura ambiente, dado que este principio es termoresistente (Figura 25).

Tampoco creemos que el principio activo de la saliva responsable de la inhibición de la agregación plaquetaria se pierda en el fraccionamiento antes mencionado por degradación proteolítica, ya que la única proteasa que está presente en la saliva es el activador de plasminógeno y su acción es muy específica. Por otra parte la saliva no actúa sobre caseína (comunicación personal del Dr. Alejandro Alagón).

Otra posibilidad que desechamos es que el mencionado principio activo de la saliva se esté quedando adherido a la columna, ya que la recuperación cromatográfica siempre fué muy cercano al 100%.

Aunque no pudimos detectar con claridad el principio activo, en la Figura 19 hay una indicación no concluyente que la actividad inhibitoria se manifiesta con mayor intensidad (para las plaquetas de un individuo, pero no para otro) en un constituyente de la saliva que tiene un peso molecular menor al inhibidor de tripsina de soya, lo cual concuerda con lo publicado⁽⁴⁾.

No obstante, al cromatografiar la saliva en la columna Sephadex G-150. si pudimos separar las actividades de activador de plasminógeno, ya reportada⁽⁴⁾, así como la actividad de fosfatasa alcalina que se reporta por

primera vez (Figuras 9, y 21).

Nuestros resultados sugieren que el factor presente en la saliva del vampiro responsable de la inhibición de la agregación de plaquetas humanas inducida por ADP, parece ser un componente protéico, ya que cuando la saliva es digerida con tripsina (Figura 26) se pierde la actividad; así mismo cuando la saliva se precipita con TCA al 5%, el sobrenadante pierde totalmente su actividad inhibitoria; cuando se dializó con una membrana de corte 7K no se perdió su actividad (Figura 24), además, notablemente, esta supuesta proteína es muy resistente a la degradación por calor, ya que conservó su actividad aun después de 15 minutos en ebullición en baño María (Figura 25).

Creemos que la saliva de vampiro *Desmodus rotundus* tiene sustancias que podrían ser de importancia biotecnológica, como fármacos para el tratamiento de enfermedades humanas vasculo-oclusivas trombótico-arteroscleróticas, ya que además de inhibir la agregación plaquetaria tiene un potente activador de plasminógeno^(4,37) y un inhibidor de la vía extrínseca de la coagulación⁽⁴⁾. Es decir en la saliva existen compuestos que evitan la génesis de trombos y compuestos que degradan los ya formados. Por tal motivo es necesario realizar más investigación en este tema que podría conducir a la purificación y caracterización de éstas y otras sustancias para su probable aplicación en medicina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Wikel Stephen K. 1982. Immune responses to arthropods and their products. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 21-48.
- (2) Ribeiro J.M.C. 1987. Role of saliva in blood-feeding by Arthropods. *Ann.Rev. Entomol.* 32: 463-478.
- (3) Ribeiro J.M.C., Vachereau A., Modi G.B. and Tesh R.B. 1988. A novel basodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* Vol. 243: 212-214.
- (4) Hawkey C. 1967. Inhibitor of platelet aggregation present in saliva of the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Brit. J. Haemat.*, 13, pp 1014-1020.
- (5) Wilkinson Gerald S. 1990. Food sharing in vampire bats. *Scientific American* February 1990: 64-70.
- (6) Hawkey C.M. 1974. Salivary antihemostatic factors, in *Natural History of vampire bats*. p. 141.
- (7) Banchard Jean y Pauak Eduard. 1989. El desarrollo de la ticlopidina. *Mundo científico* Num. 91 Vol. 9 : 530-533.
- (8) Loison G., Findeli A., Bernard S., Nguyen-Juilleret M., Rielhi-Bellon N., Corvalle D., Guerra Santos L., Brown S.W., Courtney M., Rostech C. and Lemoine Y.1988. Expression and secretion in *S.cerevisiae* of Biologically active leech hirudin. *Biotechnology*.6: 72-77.
- (9) Kleesner Arthur. 1987. Second-Generation T-PA race heats up. *Biotechnology* 5: 869-870.
- (10) Choay J., Lormeau J-C., Petitov M. 1989. Nuevos horizontes de la heparina. *Mundo Científico* 91, Vol. 9: 538-540.

- (11) Brown B.A. 1984. *Coagulation in Hematology: Principles and procedures*. 4th. Ed. pp 179-188.
- (12) Eberth J.D., Schimelbuch C. 1886. Experimentelle Untersuchungen über thrombose. *Virchow archive für Pathologische Anatomie and Physiologic Klinische Medicin* 103: 39.
- (13) Triplett Douglas A., Harms Cathy S., Newhouse Patricia and Clerk Carol. 1978. *Platelet Function. Laboratory Evaluation and clinical application*. Edit. Educational Products Division American Society of Clinical Pathologists. Chicago (317p): 12-13.
- (14) Von Pilsum John F. 1986. Metabolism of Individual tissues: Blood cells, In *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, Thomas M. Devlin (ed) Segunda Edic. pp. 842-853.
- (15) Hawiger Jacek. 1989. Platelet Secretory Pathways: An overview. *Methods in Enzymology* Vol. 169. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion. Part A (512 p). Ed. Academic Press Inc. pp 191-195.
- (16) Stryer Lubert. 1988. *Biochemistry*. Third Ed. W.H. Freeman and Company. New York. (1089 p): pp 981-982.
- (17) Vargafug B.B., Chignard M. and Benveniste J. 1981. Comentary. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* Vol. 30: 263-271.
- (18) Zucker Marjorie B. 1989. Platelet aggregation measured by the photometric method. *Methods in Enzymology* Vol. 169: 117-133.
- (19) Vane J.R. 1971. Inhibition of prostaglandin syntesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature. New. Biol.* 231 (25): 232-235.
- (20) Moncada S., Gryglewski R., Buntingand S. and Vane J.R. 1976. An enzyme isoleted from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an inestable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665.

- (21) Born G.V.R. and Cross M.J. 1963. The aggregation of platelets. *J. Physiol.* 168: 178-195.
- (22) Semejante a la ref. (11) pp: 59-63.
- (23) Molnar J. and Lorand L. 1961. Studies on apyrases. *Archiv. Biochem. and Biophys.* 93: 353-363.
- (24) Lane R.J.M. and Wasmuth N.J. 1984. Measurement of phosphate concentration in the presence of very labile phosphate esters. *Analytical Biochem.* 140: 424-427.
- (25) Leary Jeffrey J., Brigati David J. and Ward David C. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes Hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 80: 4045-4049.
- (26) Decker A. Lillian (Edit.), 1977. *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical Corporation. Freehold, New Jersey, U.S.A. 07728. (346 pp): 138-144.
- (27) Bachelot C., Rendu F., Boucheix C., Hogg N. and Levy-Toledano S. 1990. Activation of platelets induced by mAb P256 specific for glycoprotein IIb-IIIa possible evidence for a role for IIb-IIIa in membrane signal transduction *Eur. J. Biochem. FEBS* 190: 177-183.
- (28) Balduini C.L., Bertolino G., Nons P., Sinigaglia F., Bisio A. and Torti M. 1988. Interrelation of platelet aggregation, release reaction and thromboxane A₂ production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 2: 823-829.
- (29) Sinigaglia F., Bisio A., Torti M., Balduini C.L., Bertolino G. and Balduini C. 1988. Effect of GP IIb-IIIa complex ligands on calcium ion movement and cytoskeleton organization in activated platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, (1): 258-264.
- (30) Plow E.F., Pierschbacher M.D., Rouslahti E., Marguerie G.A. and Ginsberg M.H. 1985. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8057-8061.

(31) Haverstick D.M., Cowan J.F., Yamada K.M. and Sautoro S.A. 1985. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood* 66: 946-952.

(32) Johnson D.C., Ware J.A. and Salzman E.W. 1989. Measurement of platelet cytoplasmic ionized calcium concentration with aequorin and fluorescent indicators. *Methods in Enzymology* 169: 386-415.

(33) Haslam R.J. and Vanderwel M. 1989. Measurement of changes in platelet cyclic AMP *in vitro* and *in vivo* by prelabeling techniques. Application to the detection and assay of circulating PGI_2 . *Methods in Enzymology* 169: 455-471.

(34) Lazarowski E.R. and Lapetina E.G. 1989. Activation of platelet phospholipase C by fluoride is inhibited by elevation of cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 2: 440-444.

(35) Barradas M.A., Jeremy J.Y., Kontoghiorghes G.J., Mikhailides D.P., Hoffbrand A.V. and Dandona P. 1989. Iron chelators inhibit human platelet aggregation thromboxane A2 synthesis and lipoxigenase activity. *FEBS LETTERS* 245 (1,2): 105-109.

(36) Salari H., Duronio V., Howard S.L., Demos M., Jones K., Reany A., Hudson A.T. and Pelech S.L. 1990. Erbstatin blocs platelet activation factor-induced protein-tyrosine phosphorylation, polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinase C activation, serotonin secretion and aggregation of rabbit platelets. *FEBS LETTERS* 263: 104-108.

(37) Krützschmar J., Haendler B., Langer G., Boidol W., Bringmann P., Alagón A., Donner P. and Schleuning W.D. 1991. The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat *Desmodus rotundus*: molecular cloning and expression. *Gene*, en prensa.