

TD
191

R. 6661



"METODOS DE AISLAMIENTO Y FIJACION DE PLAQUETAS HUMANAS. ESTUDIO MORFOMETRICO, ESTEREOLOGICO Y CITOQUIMICO".

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 83 número 71 del libro
correspondiente. 23 MAYO 1989
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Trabajo presentado por el
licenciado ANTONIO LUIS GONZALEZ
UTOR para optar al grado de Doc-
tor en Biología.



DIRECTOR Y TUTOR

Josefina Hidalgo Jimenez
Profesora Titular de Biología Celular.

DIRECTOR

José Luis López-Campos
Catedrático de Ciencias Morfológicas.

Sevilla, Mayo de 1.989

TD
191

A mis padres.

A Inma.

"SUENA
lo que te atrevas a soñar
VE
donde quieras ir
SE
lo que quieras ser

¡VIVE!"

R. Bash.

"Mide el enciclopedista su saber por el número de cosas que conoce, al humanista no le importa saber mucho, sino solo saber las cosas esenciales, que son muy pocas, para comprender lo que no puede saberse, que es infinito".

Gregorio Marañón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Lopez-Campos por haberme proporcionado, desde mis primeros días en el laboratorio como estudiante de Citología, una valiosa orientación científica, así como por su incondicional y continuado apoyo en todo momento.

A la Dra. Josefina Hidalgo por la formación científica de ella recibida durante el desarrollo de esta Tesis, su valiosa dirección y desinteresada ayuda personal.

Al Dr. Francisco Gracia, de la Universidad de Córdoba, por las enseñanzas de él recibidas sobre morfometría y estereología.

A Remedios García por su amistad e inmensa colaboración en los procesos de microscopía electrónica.

A todos y cada uno de mis compañeros del Departamento de Biología Celular por el interés y colaboración que me han demostrado día a día. Especialmente a aquellos que se prestaron para donar su sangre en beneficio de este trabajo.

Al Dr. Luis Jimenez del Servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocío" de Sevilla, por la ayuda prestada en la extracción de sangre.

Al Dpto. de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocio" de Sevilla y al Dpto. de Anatomía Patológica de la Universidad de Málaga, por la prestación de sus servicios de M.E.

A Boehringer Ingelheim con cuya financiación se inició este trabajo.

INDICE

RESUMEN

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| - Caracteristicas Ultraestructurales..... | 9 |
| - Caracteristicas funcionales de las plaquetas en estado inactivado..... | 17 |
| TESIS A PLANTEAR..... | 22 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 24 |
| - Aislamiento..... | 25 |
| - Fijación..... | 27 |
| - Morfometría y estereología..... | 30 |
| - Citoquímica..... | 31 |
| RESULTADOS..... | 40 |
| - Morfometría y estereología..... | 40 |
| - Ultraestructura..... | 44 |
| - Citoquímica..... | 46 |
| DISCUSION..... | 53 |
| CONCLUSIONES..... | 76 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 79 |

RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio en relación a las posibles modificaciones, que se producen en las plaquetas, inducidas por los procesos de aislamiento y fijación que conlleva un análisis a microscopía electrónica.

Inicialmente comparamos dos métodos de aislamiento: 1. En plasma rico en plaquetas (PRP-citratado) a partir de la sangre completa; 2. Trás la realización de diversos lavados del PRP-citratado. La prueba de la capacidad agregante no dió diferencias apreciables entre los dos métodos de aislamiento. Sin embargo estas diferencias se pusieron de manifiesto al realizar el análisis morfométrico, pudiendose considerar que las plaquetas aisladas según el método de lavado están mejor preservadas que las no lavadas.

A continuación, una vez seleccionado el método de aislamiento, centramos nuestra atención en las posibles influencias ejercidas por los fijadores. Para ello, utilizamos tres de los tipos de fijaciones comúnmente aplicados para M.E. Aunque las estimaciones morfométricas realizadas

en material incubado en los tres fijadores permitan clasificar las plaquetas ensayadas como inactivas, el fijador modificado por nosotros (fijador C) es el que menos altera la morfología plaquetaria. En cuanto a los valores estereológicos obtenidos, las plaquetas fijadas con este método son también las que poseen los valores optimos de los gránulos, mitocondrias, sistema canalicular conectado a superficie (SCCS) y sistema tubular denso (DTS).

Como consecuencia del análisis estereológico realizado en las distintas pruebas, hemos podido constatar que el SCCS, como reservorio de membrana que pueda ser externalizado tras un proceso de activación, presenta una mayor dilatación cuanto más preservada esta la morfología de la plaqueta. Al contrario, en estas condiciones, la luz de los túbulos que constituyen el sistema de endomembranas denominado DTS, se encuentra de forma más constreñida.

Por último, se ha analizado citoquímicamente las plaquetas aisladas y fijadas según el método elegido en los análisis anteriores, demostrando la ausencia de alteraciones en la caracterización de Ca^{2+} , glucógeno y carbohidratos de superficie ni en la funcionalidad de las actividades ATPasa Na^+/K^+ y cAMPasa.

A partir de estos estudios consideramos que la membrana externa y la del SCCS de las plaquetas juegan un papel

importante en el almacenamiento de Ca^{2+} , junto a los gránulos α , gránulos densos, mitocondrias y DTS. Muy probablemente los fosfolípidos que forman parte de la membrana citoplasmática y la del SCCS sean las moléculas a las que el ión se asocia.

La actividad ATPasa Na^+/K^+ se localiza a nivel de la cara interna de las membranas en contacto directo con el medio externo (membrana exterior y membrana del SCCS); por ello la enzima, no parece mostrar compartimentalización entre estos dos dominios de la membrana plasmática, a diferencia de lo descrito por otros autores con anterioridad.

En cuanto a la actividad cAMPasa apareció claramente definida en el DTS de las plaquetas, y hemos estandarizado un método modificado para su detección citoquímica. Asimismo, y tal como se ha descrito bioquímicamente, comprobamos el efecto inhibitorio de la forskolina sobre esta actividad.

INTRODUCCION

En los mamíferos, las plaquetas son los elementos sanguíneos directamente implicados en los procesos hemostásicos y de trombosis ya que intervienen coordinando una serie compleja de acontecimientos asociados con el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos (White, 1984). Para ello, las plaquetas poseen diversas propiedades funcionales en las que se incluyen la adhesión, agregación, actividad procoagulante, consolidación del coágulo y captación de serotonina (5HT) (Frojmovic y Milton, 1982).

A lo largo de la escala filogenética, se han descrito elementos celulares que, al menos desde el punto de vista funcional, pueden homologarse a las plaquetas de mamíferos. Así, en anélidos, un tipo celular de la hemolinfa llamado eleocito posee capacidad de agregación que se manifiesta claramente en los casos de lesión tisular (Welsch y Storch, 1976). En moluscos, la hemolinfa contiene un solo tipo celular, los amebocitos que, además de intervenir en respuestas defensivas, fagocitosis y reparación de heridas,

muestran capacidad de agregación de la hemolinfa ya que esta carece de fibrina (Paniagua y Nistal, 1983; Welsch y Storch, 1976). En artrópodos, y más concretamente en los crustáceos, se han descrito tres tipos celulares en la hemolinfa que intervienen en los procesos de coagulación denominados hialocitos, hemocitos semigranulares y granulocitos. En insectos, de los distintos tipos celulares que existen en la hemolinfa, sólo el denominado cistocito interviene en el proceso de coagulación por secreción de fenoloxidasa (enzima capaz de precipitar componentes de la hemolinfa). En algunos dípteros, como por ejemplo en Calliphora, se ha descrito la presencia de otro tipo celular con capacidad de formar coágulos en la hemolinfa, conocido como células eruptivas. Estas células, con acusada tendencia a fragmentarse, dan lugar a estructuras con perfil fusiforme provistas de núcleo y angosto citoplasma (Wesch y Stoch, 1976).

En vertebrados no mamíferos, aparece un solo tipo celular asociado a los procesos hemostáticos denominado trombocito. Los trombocitos son células enteras, fusiformes que, en anfibios son de menor tamaño que los eritrocitos y con núcleo indentado mientras que en las aves el núcleo ocupa casi toda la célula (Andrew y Hichman, 1974; Paniagua y Nistal, 1983). En ciclóstomos no ha sido posible identificar trombocitos, aunque se han descrito células en forma de huso que intervienen en procesos de coagulación pero carentes de gránulos que contengan trombina. En mamífe-

ros, como mencionamos anteriormente, las plaquetas son elementos sanguíneos que intervienen en los procesos hemostáticos. Son fragmentos anucleados y fusiformes provenientes de una célula denominada megacariocito.

De los distintos elementos formes de la sangre, fueron las plaquetas el último en descubrirse. Aunque frecuentemente se atribuye el descubrimiento de las mismas a Hayen y Bizzozero en 1877 y 1882 respectivamente, fue Donné, en 1842, quien primero las describió bajo el nombre de globulinas. Posteriormente se notificó la tendencia de estos elementos a formar agregados. En 1865, el anatomista alemán Max Schultze da una clara descripción de las plaquetas pero las considera como restos de eritrocitos destrozados. Años más tarde Vulpian y Osler, en 1873 y 1874 respectivamente, proponen que las plaquetas son independientes de cualquier otro elemento sanguíneo. A partir de estos momentos, los estudios morfológicos sobre la estructura plaquetaria son más precisos pero limitados por las pequeñas dimensiones de las plaquetas y el poder resolutivo del M.O..

La primera descripción morfológica de las plaquetas a M.E. fue publicada por Wolpers y Ruska en 1939. Este trabajo fue realizado en el mismo laboratorio donde Van Borries y Ruska desarrollaban el M.E. siendo, por tanto, las plaquetas uno de los primeros materiales biológicos estudiado con este instrumento de observación (David-Ferreira, 1964).

El origen de las plaquetas fue uno de los problemas que quedaron sin resolver durante varios años. Fue en 1906 cuando Wright describe la formación de las plaquetas a partir de una célula progenitora localizada en la médula ósea, el megacariocito (Wright, 1906). Como toda hipótesis audaz, ésta tuvo ardientes oponentes y defensores pero, poco a poco, la idea de que "la célula gigante de la médula ósea forma la célula enana de la sangre" iba expresando la opinión general (David-Ferreira, 1964).

Sucesivos trabajos realizados por diversos autores confirmaron la hipótesis de que las plaquetas se forman del megacariocito por fragmentación del citoplasma (Tavassoli, 1980). Durante la maduración del megacariocito se originan repetidas duplicaciones originándose un núcleo multilobulado (Barnart y Noonan, 1978). Esta proliferación nuclear es la causa de que se produzcan megacariocitos con diferentes ploidias ($8n$, $16n$, $32n$, $64n$). En lo referente a la maduración citoplásmica, se produce un aumento del citoplasma proporcional a la ploidia nuclear y el desarrollo de diversos orgánulos (Thompson, 1986). Antes de la desintegración, el citoplasma del megacariocito se encuentra organizado en distintos territorios, demarcados por un sistema de membranas producidas a partir del retículo endoplásmico liso, cada uno de los cuales originará una plaqueta (Zucker-Franklin y Petursson, 1984).

Una vez alcanzado el torrente sanguíneo, las plaquetas presentan forma lentiforme o redondeada con superficie lisa (Barnhart y Noonan, 1978). No está claramente establecido si la adquisición de la forma es anterior a la separación de la plaqueta del megacariocito o la adquiere posteriormente por un proceso de reorganización (Frojmovic y Milton, 1982).

Las plaquetas que entran en la circulación desde la médula ósea son temporalmente secuestradas en dos "pools" intercambiables: uno situado en el bazo (Aster, 1966; Penny y cols., 1966) y otro no esplénico cuyo origen anatómico no está claramente definido (Vilen y cols., 1980).

El número de plaquetas en sangre es de 250.000 por mm^3 , aproximadamente, estando comprendidos sus límites normales entre 150.000 y 350.000/ mm^3 (Ratto y cols., 1970). Estos valores pueden presentar variaciones debido a procesos patológicos y/o fisiológicos como la altitud, estación del año, edad, etc. (Platt, 1982).

La vida media de una plaqueta es de nueve días. Finalmente, la plaqueta ya envejecida es capturada y fagocitada por macrófagos sésiles situados en el bazo (Barnhart y Lusher, 1975) y sinusoides hepáticos (Walsh y Barnhart, 1969). En determinadas circunstancias, macrófagos errantes,

como los monocitos, pueden también fagocitar las plaquetas (Barnhart y Noonan, 1978).

Como mencionamos anteriormente, las plaquetas intervienen en procesos hemostáticos y de trombosis, para lo cual requieren una gran sensibilidad frente a agentes químicos y físicos ya que, con su activación, las plaquetas producen una respuesta ante un daño en la pared de los vasos sanguíneos.

El primer suceso que ocurre cuando una plaqueta empieza a activarse es un cambio en su forma. Por ello, han sido numerosos los obstáculos que han debido superarse para llegar al conocimiento actual de la morfología plaquetaria, ya que es extremadamente difícil aislarlas de los demás elementos de la sangre sin causarles un daño irreparable o una agregación irreversible (White, 1983).

En la sangre, las plaquetas pueden presentar diversas morfologías que, según Frojmovic y Milton (1982, 1983), se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de la razón entre sus ejes (razón axial o rp ; $rp = \text{eje menor} / \text{eje mayor}$). Así, tenemos:

- Discocitos (D): Plaquetas lisas de forma discoidal con una $rp < 0.5$. Están presentes en un 65-90%.

- Esferoequinocitos (SE): Plaquetas esféricas con gran número de pseudópodos y un $rp > 0.9$. Están presentes en un 0-2%.
- Discoequinocitos (DE): Aquellas que no satisfacen el criterio para D y SE. Están presentes entre un 10-35%.

El significado de esta distinta morfología plaquetaria ha sido estudiado durante la agregación inducida por ADP. La adición de ADP produce una activación plaquetaria con el consecuente cambio de discocito a discoequinocito y de discoequinocito a esferoequinocitos. Esta transformación se produce en un intervalo de 1 a 3 min, observándose la mayor concentración de DE a los 10 sg y de SE entre los 1-3 min. Estos datos sugieren que la capacidad funcional de los distintos estados morfológicos no son equivalentes y dependen del estado de activación (Milton y cols., 1981).

Así, las plaquetas circulantes no activadas presentan la morfología de discocitos con finos y pequeños pseudópodos (diámetro de $0.05 \mu m$ y longitud de $1-2 \mu m$), ligero ahuecamiento y extremos redondeados (Allen y cols., 1979). El inicio de la activación conlleva al cambio de forma anteriormente comentado y consecuentemente se produce un aumento del rp (las plaquetas se hacen más esféricas) y del número de pseudópodos que, además, son de mayor tamaño (longitud de $2-5 \mu m$) (SkjØrten, 1968). Los pseudópodos, tanto cortos como largos, se proyectan radial o tangencialmente al eje mayor

del disco. En los equinocitos se observan también numerosas rugosidades a lo largo de toda la superficie que podrían ser reflejo de gránulos secretorios en fase de exocitosis (Frojmovic y Milton, 1982).

Por otra parte, se ha descrito que el porcentaje de los diferentes estados morfológicos pueden variar en función del sexo. Así, el porcentaje de discocitos suele ser mayor en la mujer que en el hombre (Milton y Frojmovic, 1983).

Además de las diferencias morfológicas, las plaquetas circulantes muestran diferencias en cuanto al tamaño. El volumen de un discocito humano inactivado es de aproximadamente $6.0 \mu\text{m}^3$ pero puede variar de 3.8 a $7.5 \mu\text{m}^3$ (Milton y Frojmovic, 1983). Esta heterogeneidad entre plaquetas grandes y pesadas y pequeñas y ligeras no es solo morfológica sino también funcional, siendo las plaquetas grandes más funcionales que las pequeñas (Thompson y cols., 1983; Thompson, 1985). Esta diversidad parece ser debida a la maduración y heterogeneidad del megacariocito, ya que una mayor ploidía del megacariocito va a dar lugar a plaquetas más grandes y pesadas (Penington y cols., 1976; Thompson, 1986).

CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES

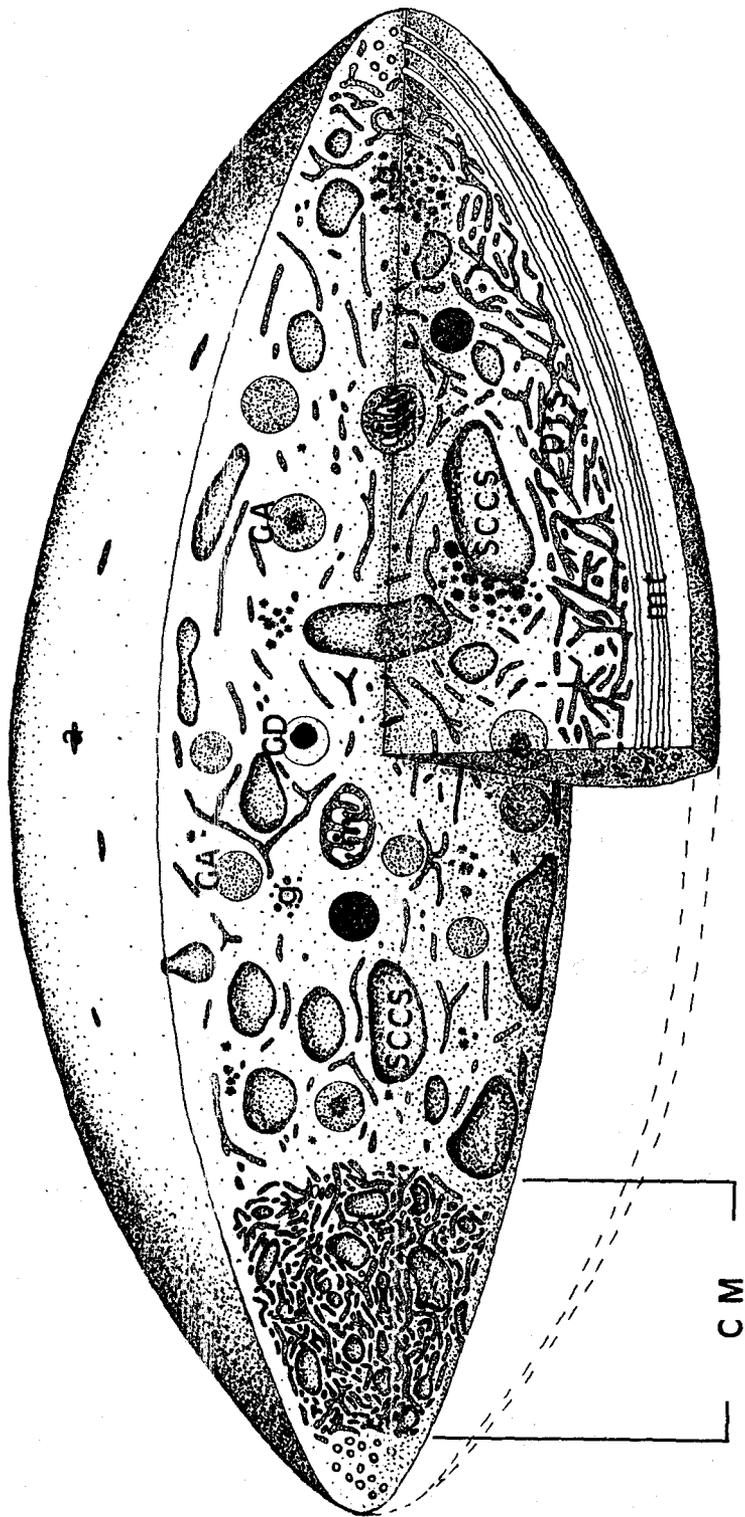
Son diversos los trabajos encaminados al mejor conocimiento de la estructura plaquetaria (Esquema I). Para White (1971a,b), las plaquetas pueden ser divididas ultraestructuralmente en cuatro regiones: zona periférica, zona citosólica (sol-gel), zona de orgánulos y sistema de endomembranas.

La zona periférica, o región plaquetaria en contacto con el medio externo, está a su vez constituida por tres componentes:

- a) Membrana de superficie y membrana que delimita el sistema canalicular conectado a superficie (SCCS), que proviene de invaginaciones de la membrana superficial.
- b) Cubierta externa.
- c) Zona citosólica en contacto directo con la membrana externa.

La membrana externa (membrana superficial y del SCCS) muestra, al igual que otras membrana biológicas, una clara asimetría en cuanto a la distribución de los fosfolípidos. Así, los fosfolípidos ricos en araquidonatos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol) están situados preferentemente en la cara citosólica de la membrana, mientras que la fosfatidilcolina se encuentra igualmente representada en ambos lados de la membrana (Perret y cols., 1979; Bearer y Friend, 1986). Asimismo,

ESQUEMA I: Representación esquemática de la morfología típica de un discocito. GA Gránulo α . GD Gránulo denso. m Mitochondria. SCCS Sistema Canalicular Conectado a Superficie. DTS Sistema Tubular Denso. CM Complejos de Membranas. g Glucógeno. mt Microtúbulos. a Aperturas del SCCS al medio externo.



observaciones al microscopio de barrido de plaquetas crio-fracturadas han puesto de manifiesto la existencia de una serie de partículas de diversos tamaños mayoritariamente localizadas en la cara E de la membrana (Zucker-Franklin y Petursson, 1984).

Exteriormente, las plaquetas están envueltas por una cubierta, de 15-20 nm de espesor, caracterizada por su carga negativa neta y su alto contenido en carbohidratos (White, 1971a). Esta zona juega un papel importante en la interacción de las plaquetas con su medio externo y, en particular, en la función de hemostasis. Por técnica de detección bioquímica y de aislamiento se han determinado 50 componentes glicoproteicos reconocibles en la membrana plasmática de las plaquetas, aunque sólo ocho de ellos (GPIa, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa, IV y V) han sido mayoritariamente estudiados (Clemmetson, 1985). Algunas de estas glicoproteínas han sido igualmente localizadas formando parte de membranas internas, como la GPIIb-GPIIIa que es un componente de la membrana de los gránulos α (Goggstad y cols., 1981).

Los canales que constituyen el SCCS son invaginaciones tubulares de la membrana superficial. Estos canales están interconectados entre sí formando una red anastomosada de conductos fenestrados que se extiende por todo el citoplasma, desde una cara de la plaqueta a la opuesta (White y Clawson, 1980). En ambas caras, y agrupadas predo-

minantemente en la zona periférica, se han observado unas 33 aperturas/plaqueta con una variación de tamaño compendida entre 0.05-0.2 μm (Frojmovic y Milton, 1982).

El SCCS incrementa notablemente el área de la superficie de contacto con el plasma, siendo esta superficie muchísimo mayor que la esperada para un tamaño o volumen celular dado. Este sistema se considera un reservorio de membranas ya que puede evaginarse una vez producida la activación y cambio de forma contribuyendo, de esta manera, a aumentar la razón área de superficie/volumen (Milton y Frojmovic, 1979). Otras de las funciones propuestas para el SCCS es su intervención en mecanismos de endocitosis (Zucker-Franklin, 1981) y como vía secretora (Holme y cols., 1973). A pesar de la importancia funcional de este sistema, es de destacar su ausencia en las plaquetas de bovinos (Zucker-Franklin y cols., 1985).

La región submembranosa se corresponde con el área citosólica que se extiende justo por debajo de la unidad de membrana de la superficie de la plaqueta. Esta zona tiene características especiales mostrando carencia de orgánulos en plaquetas no estimuladas. Posee un sistema regular de elementos filamentosos tanto a nivel de la membrana plasmática (White, 1969) como a nivel de la membrana del SCCS (Zucker-Franklin, 1978).

Numerosas proteínas forman parte del citoesqueleto de la plaqueta, siendo la actina la única que se encuentra en forma filamentosa cuando la plaqueta está inactivada (Fox y cols., 1984). La actina F interacciona con la membrana a través de una proteína, de PM 250.000 y compuesta de dos subunidades, llamada proteína de unión a la actina (ABP) que a su vez está anclada a la glicoproteína Ib de la membrana en la plaqueta inactivada. Otras proteínas identificadas en las plaquetas tales como vinculina y espectrina, y que en otros tipos celulares tienen una demostrada capacidad de unión a actina, han sido propuestas como responsables de esta interacción. Sin embargo, en las plaquetas no activadas parece ser que muy probablemente ésta no sea su función (Fox y Phillips, 1986). La malla regular de proteínas filamentosas y los puntos de anclaje de éstas a la membrana ayudan al mantenimiento de la forma discoidal de la plaqueta. Asimismo, contribuyen a la extrusión y estabilización de pseudópodos e interaccionan con otros elementos del mecanismo contractil para que se lleve a cabo el cambio de forma así como la retracción del coágulo (White, 1984).

Los microtúbulos es otro de los elementos del citoesqueleto que se encuentra en la matriz hialoplasmática de la plaqueta. La banda de microtúbulos está formada de 8 a 20 anillos de aproximadamente 25 nm de diámetro. Estos son concéntricos en el plano ecuatorial de la plaqueta y sus circunferencias se encuentran justo por debajo de la zona

submembranosa. Los anillos están separados y sólo ocasionalmente se observan pequeños puentes entre ellos (White, 1984). El anillo de microtúbulos, como parte fundamental del citoesqueleto de la plaqueta, soporta la forma discoidal en el estado inactivado y no se disuelve después de la exposición de las células a potentes activadores (Escolar y cols., 1987). También interviene en el cambio de forma, contracción interna, secreción y agregación irreversible aunque de forma muy insignificante (White, 1983).

La zona de orgánulos comprende diversos tipos de estructuras: mitocondrias, gránulos densos, gránulos α , lisosomas, peroxisomas y glucógeno. De entre todos ellos los que mejor se diferencian, dada sus características ultraestructurales, son las mitocondrias. Se observan elípticas o esféricas, con pocas crestas y en un número comprendido entre 5 y 12 por plaqueta (Stahl y cols., 1978; Werner y Morgenstern, 1980). Además de su conocida función en el metabolismo energético, se ha postulado que podrían intervenir en la regulación de la concentración de calcio intracelular (Gross y Schneider, 1971).

Los gránulos densos se caracterizan por presentar un núcleo intensamente opaco que, a menudo, se encuentra separado de la membrana por un halo claro (White y Gerrard, 1978). Estos gránulos almacenan nucleótidos de adenina (ATP y ADP), cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), 5-hidroxitrip-

tamina y fosfato inorgánico a muy altas concentraciones (Reimers, 1985). Las altas concentraciones de los componentes almacenados dan lugar a que éstos se dispongan constituyendo una "superestructura", ya que si se presentaran en solución la presión osmótica que producirían provocaría la ruptura del gránulo (Da Prada y cols., 1981). El número de estos es muy pequeño, existiendo gran disparidad de opiniones entre los diversos autores puesto que la forma de extracción y fijación de las células es directamente proporcional a la preservación de estos gránulos (White, 1983).

Los gránulos α son los más abundantes en el citoplasma encontrándose unos 60-70 por plaqueta (Stahl y cols., 1978). Las proteínas almacenadas en estos gránulos se pueden clasificar en dos grupos (Niewiarowski y Holt, 1985):

- Proteínas específicas de las plaquetas

Factor 4 plaquetario (PF₄)

Beta-tromboglobulinas (β TG)

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

- Proteínas similares o idénticas a proteínas plasmáticas

Trombospondina

Factor von Willebrand (VIII₂R:Ag)

Fibrinógeno

Factor V

Fibronectina, etc.

Ultraestructuralmente, los gránulos α pueden ser diferentes entre sí en lo referente a su opacidad, presencia o ausencia de estructuras o zonas semejantes a nucleóides, así como en su tamaño y forma (White y Gerrard, 1978).

La presencia de lisosomas fue puesta de manifiesto al determinar citoquímicamente su contenido en fosfatasas ácidas y arylsulfatasas (Bentfeld-Barker y Bainton, 1975). De esta manera, pudieron diferenciarse claramente de los gránulos α a los que son muy similares ultraestructuralmente. La población lisosomal es muy heterogénea, hecho que se ha observado tanto en gradiente de densidad (Fukami y Salganicoff, 1977) como al analizar el porcentaje de reacción de las enzimas lisosomales (Bentfeld-Barker y Bainton, 1982). Sin embargo, Morgenstern y Janzarik (1985), realizando un estudio citoquímico comparativo para determinar la presencia de fosfatasas ácidas, fibrinógeno y β -TG, concluyeron que estas sustancias únicamente se encuentran en un tipo de gránulos, los gránulos α .

Los peroxisomas, caracterizados citoquímicamente por su actividad peroxidasa, son de pequeño tamaño y semejantes a los peroxisomas encontrados en otros tipos celulares (Breton-Gorius y Guichard, 1975).

El glucógeno de las plaquetas humanas se encuentra en forma β , con un diámetro de 30-40 μ m y constituido por 18-22

subunidades del tipo τ . Está disperso regularmente por todo el citoplasma y es muy semejante al observado en células del hígado, músculo y leucocitos (Vainer y cols., 1970).

En lo referente al sistema de endomembranas, en el citoplasma existe una serie de canales, fácilmente diferenciables de los que forman el SCCS por su contenido en material amorfo de similar opacidad al citoplasma (White, 1984) denominado Sistema Tubular Denso (DTS). Las cisternas tubulares se encuentran dispuestas al azar en el citoplasma de la plaqueta, aunque pueden observarse en estrecha asociación con la banda de microtúbulos (Caron y Berlin, 1979; Morgens-tern y Janzarik, 1977).

El DTS se origina a partir del RER del megacariocito y por lo tanto podría asimilarse a REL residual (White, 1972). Como veremos más adelante, este sistema juega un papel importantísimo en el mantenimiento del estado inactivado, así como en los primeros procesos de la activación.

En una o dos áreas, generalmente localizadas excentricamente en el citoplasma de la plaqueta, se observa una íntima asociación física entre el SCCS y DTS, denominada complejos de membrana (White, 1984). En réplicas de plaquetas criofracturadas se observa que en estas áreas, el SCCS está congregado en grupos dentro de los cuales se caracterizan canalículos de DTS, estando sus membranas prácticamente

en aposición. En los complejos de membranas se ha observado como el SCCS es un sistema fenestrado y como los canalículos del DTS están localizados en cada apertura o fenestra (White, 1975).

CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LAS PLAQUETAS EN ESTADO INACTIVADO

La regulación del estado inactivado en plaquetas deriva de una serie de acontecimientos, cuyo fin es el mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático por debajo del nivel requerido para la activación celular (Statland y cols., 1969). El Ca^{2+} está considerado como un "segundo mensajero" en el proceso de activación tras la estimulación producida por un número variado de agentes agregantes (Gerrard y cols., 1981).

Los lugares almacenadores de calcio en plaquetas son el DTS, membrana externa, gránulos densos y mitocondrias, aunque solo el calcio almacenado en los dos primeros interviene, de forma inmediata, en el incremento de la concentración de calcio citoplasmático tras un proceso de activación (Gerrard y White, 1978; Thompson y Scrutton, 1985).

El DTS, principal responsable de la captación y almacenamiento del Ca^{2+} , presenta gran similitud con el retículo sarcoplásmico de las células musculares esqueléticas, mientras que la asociación del SCCS y DTS mediante complejos de membranas han sido homologados a las diadas y triadas de tales células (White, 1984). Además, la acumulación de calcio en el interior de los túbulos del DTS esta asociada a una ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ similar a la observada en el retículo sarcoplásmico (Dean y Sullivan, 1982). Por ello, la captación de Ca^{2+} llevada a cabo por el DTS es un proceso dependiente de energía (Metz y cols., 1984), a diferencia de la entrada de este ion a través de la membrana plasmática que ocurre por difusión pasiva. Sin embargo, la salida a través de dicha membrana se ha postulado que podía ser realizado por un proceso activo mediado por una ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ o por un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o bien por una combinación de ambos (Bras, 1985). Experiencias tanto citoquímicas como bioquímicas señalan la ausencia de actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el plasmalema de la plaqueta (Steiner y Lüscher, 1985), si bien esta actividad enzimática ha sido puesta de manifiesto en la membrana de SCCS (Cutler y cols., 1981).

En la membrana plasmática se ha determinado actividad ATPásica Na^+/K^+ (Cutler y cols., 1980) cuya función es disminuir la concentración de Na^+ intracitoplásmico en la plaqueta inactivada (Akerman, 1982). En tal sentido, el

proceso de estimulación viene precedido por un aumento de tal ión en el citoplasma, por medio de un intercambio Na^+/H^+ , lo cual produciría una alcalinización citoplásmica fundamental como prerrequisito para la movilización del Ca^{2+} de los lugares de almacenamiento (Siffert y Akkerman, 1987; Siffert y cols., 1987).

En la membrana del DTS se encuentra presente una actividad cAMPasa (Cutler y cols., 1978). El producto de la acción de este enzima, el AMP cíclico, tiene como función el control del calcio libre citoplásmico por debajo de los niveles que pueden producir activación, ya que inhibe su movilización y estimula su secuestro en el DTS (Blache y cols., 1987).

El denominado sistema adenilato ciclasa esta constituido por (Hanoune y cols., 1985):

- unidad catalítica que produce el AMP cíclico
- receptores hormonales que pueden ser estimuladores (R_m) o inhibidores (R_i)
- dos sistemas acopladores llamados N_m y N_i , con actividad GTPasa y cuyo estado activado es regulado por GTP y Mg^{2+} .

Son numerosos los compuestos, hormonales y no hormonales, que regulan la formación del cAMP, inhibiendo o estimulando los diferentes sistemas que componen la adenilato ciclasa (Aktories y Jakobs, 1985). Además, los niveles

de cAMP están regulados por la actividad cAMP-fosfodiesterasa que rompe el anillo cíclico. Inhibidores de esta actividad enzimática aumentan los niveles de cAMP, con lo cual se reduce la movilización de Ca^{2+} libre desde el DTS al citoplasma inducida por el agente agregante ADP (Lanza y cols., 1987).

Además de la movilización del calcio al interior del DTS, el cAMP juega un importante papel en un segundo sistema, generador de respuestas a diversos factores hormonales, denominado vía metabolizante de fosfoinositoles (Watson y cols., 1984). La generación de una señal por alguno de los agentes que inhiben la actividad adenilato ciclasa activa la hidrólisis, por la fosfolipasa C, de diversos fosfoinositoles unidos a membrana para formar inositol bi y trifosfato y de 1,2 diacilglicerol. Estos compuestos son necesarios para una completa agregación por salida de Ca^{2+} libre desde el DTS hacia el citoplasma y estimulación de una proteína quinasa C (Berridge, 1984). La acción del cAMP sobre esta vía es inhibidora, actuando sobre la actividad de la fosfolipasa C más que a nivel de cualquiera de sus sustratos (Jakobs y cols., 1986).

Como hemos podido ver a lo largo de este apartado, la plaqueta, en su estado inactivado, ha sido enormemente estudiada a muchos niveles. Sin embargo, a nivel ultraes-

tructural, los métodos de aislamiento y fijación utilizados han sido muy heterogéneos sin discernir el daño que se les produce. Debido a estos métodos, necesarios para su estudio y que siempre comportan un compromiso para la integridad celular, los resultados que se obtienen podrían dar lugar a ideas equivocadas sobre la morfología y comportamiento citoquímico de las plaquetas, así como a confusión entre los datos aportados por diversos autores.

TESIS A PLANTEAR

En el presente trabajo es nuestra intención realizar un estudio comparativo de distintos métodos de aislamiento y fijación de plaquetas humanas. Para ello, las líneas experimentales diseñadas han sido:

1.- Comparación morfométrica y estereológica de dos métodos de aislamiento de plaquetas. En uno de ellos, las plaquetas son directamente fijadas en el plasma rico en plaquetas, obtenido a baja centrifugación de sangre completa citratada (PRP-citratado). El segundo consiste en la realización de una nueva centrifugación, tras la obtención del PRP-citratado, y resuspensión del pellet en una solución de lavado según Patscheke (1981). La fijación se lleva a cabo posteriormente.

2.- Determinado el mejor método de aislamiento, se realizara otra comparación, tanto morfométrica como estereológica, de tres diferentes protocolos de fijación de plaquetas para microscopía electrónica.

3.- Posteriormente se llevará a cabo un examen citoquímico para observar la funcionalidad de determinadas actividades enzimáticas (ATPasa Na^+/K^+ y cAMPasa) así como la caracterización de Ca^{2+} , glucógeno y carbohidratos de superficie en plaquetas aisladas y fijadas según la mejor metodología anteriormente analizada.

De esta forma, pretendemos obtener un método de aislamiento y fijación que permita conseguir una buena conservación ultraestructural de las plaquetas, de manera totalmente objetiva, gracias al análisis morfométrico y estereológico. Además, comprobaremos citoquímicamente determinadas actividades enzimáticas que reflejen el mantenimiento funcional de la célula. Con todo ello, esperamos obtener una idea bastante precisa de como es la plaqueta en el torrente sanguíneo, lo cual es de gran importancia desde el punto de vista del conocimiento de su función en la hemostasis, así como de diversas patologías, tanto morfológicas como funcionales, que se observan en el hombre.

MATERIAL Y METODOS

La sangre fue obtenida de individuos varones, sanos, de edad comprendida entre 20-25 años, no fumadores y que no habían sido tratados con ningun fármaco que pudiera interferir en la actividad plaquetaria, al menos un mes antes de la extracción de sangre. La extracción se realizó por punción en vena antecubital con agujas de 21G en tubos siliconizados VACUTAINER. Inmediatamente la sangre se trasvasó a tubos de plástico (9.0 x 1.5 cm) que contenían 1/7 (v/v) de anticoagulante ACD, N.I.H. fórmula A (ácido cítrico 0.8%; citrato sódico 2.2%; D(+)-glucosa 2.45%), mezclándose suavemente. La sangre completa citratada se centrifugó a 360 g en una centrífuga con rotor vasculante durante 15 min. El plasma sobrenadante, rico en plaquetas (ACD-PRP), fue retirado con una pipeta automática con punta de plástico y subdividido en alícuotas de 3 ml. A cada tubo, conteniendo ACD-PRP, se le añadió 1/9 (v/v) de ACD para bajar el pH a 6.5, así como solución stock I de Apirasa (Anexo I) y solución stock II de PGE₁ (Anexo II) estos

últimos en proporción de 500 μ l y 36 μ l, respectivamente, por cada 100 ml de ACD-PRP (Patscheke y Wörner, 1978). Seguidamente se centrifugó a 1200 g durante 15 min, eliminándose el plasma sobrenadante.

AISLAMIENTO

El pellet de plaquetas se procesó por dos vías distintas antes de su fijación para M.E.:

1.- Pellet de plaquetas sin lavar: las plaquetas fueron directamente resuspendidas en 2.5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2, a t_a laboratorio y se centrifugó a 1200 g durante 15 min. Posteriormente permanecieron en solución fijadora durante 2 h.

2.- Las plaquetas se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado (Anexo III) y fueron trasvasadas a un tubo cónico (10.0 x 1.5 cm) donde se les añadió tampón de lavado hasta un volumen igual al menos a la mitad del ACD-PRP inicial (Patscheke, 1981). Posteriormente las plaquetas lavadas fue-

ANEXO I: Solución stock de Apirasa
50 mgr de Apirasa grado I de patata en 10 ml de tampón de lavado (Anexo III). Esta solución puede prepararse con anterioridad y conservarse a -20°C en fracciones de 0.5 ml durante varios meses.

ANEXO II: Soluciones stocks de PGE₁
- Solución stock I: 1 mg de PGE₁ en 1 ml de etanol 70°.
- Solución stock II: solución stock I diluida a 1/10 (v/v) en etanol de 70°. La solución stock I puede ser previamente preparada y conservarse a -20°C y oscuridad durante 1 mes.

ron centrifugadas y sometidas a un segundo lavado antes de su fijación como se mencionó en el apartado anterior.

Todas las muestras fueron postfijadas en OsO_4 al 1% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Seguidamente, los pellets fueron deshidratados mediante el uso de acetonas de graduación creciente e incluidos en resina epoxi según el método de Spurr (1969). Entre los pasos de deshidratación correspondientes a acetonas de 70° y 80° se efectuó una tinción con acetato de uranilo al 1% durante 12 h.

Los cortes finos, se 40-60 nm, se realizaron con una cuchilla de diamante (DIATOME, Suiza) en un ultramicrotomo ULTRACUT (Reichert-Jung) y fueron recogidos en rejillas de

ANEXO III; Solución tampón de lavado y reacción (Patscheke, 1981):

| | Sol. Lavado ^a | Sol. Tampón ^b |
|--|--------------------------|--------------------------|
| ClNa, mM | 100 | 136 |
| ClK, mM | 5 | 2.5 |
| Cl ₂ Ca, mM | 2 | 2 |
| Cl ₂ Mg, mM | 1 | 1 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ , mM | 5 | 5.5 |
| C ₆ H ₁₂ O ₇ , mM | 36 | - |
| PO ₄ H ₂ Na, mM | - | 0.32 |
| CO ₂ HNa, mM | - | 25 |
| Hepes, mg/ml | - | 1.19 |

a) Ajustar el pH a 6.5 con NaOH concentrado. Añadir antes de su uso:

- Albúmina de suero bovino, 3.5 mg/ml
- Apirasa sol. stock, 500 μ l/100 ml
- PGE₁ sol. stock II, 36 μ l/100 ml

b) Ajustar el pH entre 7.3-7.4. Añadir antes de su uso albúmina de suero bovino, 3.5 mg/ml.

cobre. Este material fue contrastado con acetato de uranilo al 7.5% durante 20 min, lavado y tratado con citrato de plomo de Reynolds (1962) durante 5 min.

Las observaciones y tomas de fotografías se llevaron a cabo en un M.E. de transmisión ELMISCOP 109 (Siemens) y PHILIPS EM 300. Para un análisis previo, se obtuvieron cortes semifinos ($0.5 \mu\text{m}$) que fueron teñidos con azul de toluidina y observados a M.O.

Anterior a la fijación, como control del estado de las plaquetas, se observó la respuesta de agregación ante ácido araquidónico, ADP, epinefrina y trombina por medio de un AGGRECODES PA-310 Daiichi (Kagaku Co. Ltd). Para ello, las plaquetas obtenidas por los dos métodos de aislamiento fueron resuspendidas en tampón de reacción (Anexo III), en número de $1.9 - 2.1 \times 10^9$ plaquetas/ml. Seguidamente, y en una cubeta de reacción se le añadieron, a $400 \mu\text{l}$ de plaquetas en tampón de reacción, fibrinógeno al 10.4%. Una vez en el agregómetro y junto con el agente agregante, se le adicionó $30 \mu\text{l}$ de Cl_2Ca 25 mM.

FIJACION

Una vez obtenido el mejor método de aislamiento de plaquetas, intentamos observar la repercusión de la fijación para M.E., para lo cual utilizamos tres tipos de fijadores distintos:

1.- Fijación según Patscheke (1981):

- a) Fijación, durante 5 min, en un volumen igual al de la suspensión de plaquetas en paraformaldehído (1.5%) y glutaraldehído (1.5%) en tampón fosfato de Millonig 0.09 M pH 7.3.
- b) Centrifugación a 1200 g durante 15 min prosiguiendo la fijación del pellet durante 2 h a 4°C.
- c) Lavado en el mismo tampón y postfijación en OsO₄ al 1% en tampón cacodilato pH 7.3, durante 1h a 4°C.

2.- Fijación según White (1983):

- a) Fijación, durante 5 min, en igual volumen que la solución de plaquetas en 0.1% de glutaraldehído en solución salina de White:

- 8.9 ml agua destilada
- 0.5 ml solución salina A de White (Anexo IV)
- 0.5 ml solución salina B de White (Anexo IV)
- 0.1 ml de glutaraldehído al 10%

ANEXO IV; Soluciones salinas de White:

| | | |
|-------------|--|--------|
| Solución A: | ClNa | 140 g |
| | ClK | 0.75 g |
| | SO ₄ Mg | 0.55 g |
| | (NO ₃) ₂ Ca.4H ₂ O | 1.5 g |
| | Agua destilada | 100 ml |
| | Refrigeración a 4°C | |

| | | |
|-------------|--|---------|
| Solución B: | CO ₃ Na | 1.1 g |
| | PO ₄ Na ₂ .7H ₂ O | 0.22 g |
| | PO ₄ H ₂ K | 0.052 g |
| | Rojo Fenol | 0.01 g |
| | Agua destilada | 100 ml |
| | Disolver a t _a ambiente | |
| | Burbujear con CO ₂ | 15 sg |
| | Mezclar y ajustar el pH a 7.4 | |
| | Refrigeración a 4°C | |

b) Centrifugación a 1200 g durante 15 min, decantando el sobrenadante y añadiendo 3% de glutaraldehido en solución salina de White:

- 6 ml de agua destilada
- 0.5 ml solución salina A de White
- 0.5 ml solución salina B de White
- 3 ml de glutaraldehido al 10%

c) Permanencia de las muestras, durante 2h a 4°C, en la solución fijadora anterior y postfijación, durante 1h a 4°C en OsO₄ al 1% en tampón veronal acetato de Zetterquist:

- 5 ml OsO₄ al 2%
- 2 ml de tampón stock Zetterquist (Anexo V)
- 0.68 ml solución stock salina (Anexo V)
- 2 ml ClH 0.1N
- 0.32 ml agua destilada

3.- a) Fijación, durante 5 min, en glutaraldehido al 1% en solución de lavado de Pastcheke (Anexo III). La dilución del glutaraldehido en la solución de Pastcheke se realiza justamente antes de la fijación utilizando el mismo volumen de fijador que de solución de plaquetas.

ANEXO V: Tampón veronal de Zetterquist:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Tampón stock: Barbitol sódico | 14.7 g |
| Acetato sódico | 9.7 g |
| Agua destilada | 500 ml |

Stock de solución salina:

| | |
|--------------------|--------|
| ClNa | 20 g |
| ClK | 1 g |
| Cl ₂ Ca | 0.5 g |
| Agua destilada | 250 ml |

- b) Centrifugación a 1200 g y renovación del fijador, continuando el proceso de fijación durante 2 h a t_a ambiente.
- c) Lavado en solución de lavado y postfijación, durante 1 h a 4°C, en OsO_4 en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2.

MORFOMETRIA Y ESTEREOLOGIA

Las fotografías fueron tomadas al azar con un aumento total de 21.000 y 35.000 para la realización de los cálculos absolutos y relativos respectivamente. De las fotografías a 21.000 aumentos, fueron sometidas a estudio un total de 788 secciones transversales de plaquetas, en un analizador de imágenes automático IBAS (Kontron Bildanalyse FRG). Se examinaron los datos absolutos de área, perímetro de sección y longitud del eje menor y mayor. Los cálculos de volumen y superficie de las plaquetas fueron hechas bajo la concepción geométrica de un elipsoide rotacional (Frojmovic y Panjwani, 1976; Sthal y cols., 1978).

$$V = (4/3)\pi(\text{eje mayor}/2)^2 (\text{eje menor}/2)$$

$$S = (\pi/2)\text{eje mayor}^2 + (\pi/4)\text{eje menor}^2 ((\text{eje mayor} + \text{eje menor}) / (\text{eje mayor} - \text{eje menor})) \log (\text{eje mayor}/\text{eje menor}).$$

Las fotografías de plaquetas con una ampliación final de 35.000 fueron utilizadas para la obtención de los datos relativos: Densidad de volumen (V_v), Densidad de superficie (S_v) y Densidad numérica (N_v). Se muestrearon un total de

169 secciones de plaquetas y se utilizaron plantillas constituidas por una malla de cuadrados simples perfectos de 0.5 cm de lado. Los datos relativos se obtuvieron por las siguientes fórmulas:

$$Vv_1 = P/P_t$$

$$Sv_1 = 2P_1 / (d \times P_t)$$

$$Nv_1 = (K/\beta d^3) \times (Na^{3/2} / P_t \times P^{1/2})$$

siendo: d=distancia entre dos puntos de la cuadrícula; Na=número de partículas por células; P_t =suma de puntos sobre el área de referencia; P=suma de puntos sobre la partícula; P_1 =suma de intersecciones de las líneas horizontales de la plantilla con los perfiles de los componentes celulares considerados; β es un coeficiente de fórmula que en nuestro caso estimamos de 1.382 (para partículas esféricas) y k es un coeficiente de distribución de tamaños, que en nuestro caso tiene un valor de 1.07 (Weibel y cols., 1969; Weibel, 1979).

CITOQUIMICA

Una vez obtenido, tanto por morfometría como por estereología, el mejor método de preservación para M.E. de las plaquetas, se realizaron una serie de técnicas citoquímicas. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes métodos:

HIERRO COLOIDAL (Courstens y Fournier-Delpech, 1979)

1.- Los pellets plaquetarios fueron sumergidos, después de la fijación, en ácido acético glacial al 12% durante 20 min a 4°C.

2.- Incubación en solución trabajo de hierro coloidal, 24 h

| | |
|--|-------|
| Sol. madre dializada frente a agua destilada | 10 ml |
|--|-------|

| | |
|--------------------------|--------|
| - Cloruro férrico al 29% | 4.4 ml |
|--------------------------|--------|

| | |
|------------------|--------|
| - Agua destilada | 200 ml |
|------------------|--------|

| | |
|-----------------------|-------|
| Acido acético glacial | 12 ml |
|-----------------------|-------|

| | |
|----------------|-------|
| Agua destilada | 18 ml |
|----------------|-------|

3.- Lavados en ácido acético glacial al 12%, 20 min

4.- Deshidratación e inclusión

ACIDO PERYODICO-TIOCARBOHIDRAZIDA-PROTEINATO DE PLATA (PATCH-Ag) (Thiery, 1967).

Para la realización de esta técnica se utilizó material fijado pero no postfijado en OsO_4 ni contrateñido con acetato de uranilo e incluido en Spurr.

1.- Secciones finas recogidas en rejillas de oro fueron tratadas por flotación con ácido peryódico al 1% en agua destilada durante 20 min.

2.- Lavados en agua destilada:

- Dos baños rápido

- Tres baños de 10 min cada uno

3.- Tratamiento con tiocarbohidrazida al 0.2% en una solución de ácido acético glacial al 20% en agua destilada durante 40 min, 48 h y 72h.

4.- Tratamiento con proteinato de plata al 1% en agua destilada a t_a ambiente y en oscuridad durante 30 min

5.- Lavados cuidadosos en agua destilada.

Como controles, algunas secciones fueron tratadas con proteinato de plata sin previo tratamiento con tiocarbohidrazida o bien sólo con tiocarbohidrazida.

PIRANTIMONIATO POTASICO (Borges y cols., 1984).

El piroantimoniato potásico, como reactivo citoquímico fué utilizado según dos protocolos:

a) Método Oxalato-piroantimoniato (OPA)

1.- Fijación, en igual volumen a la solución de plaquetas, con glutaraldehído al 3% en ácido oxálico 0.09 M, ajustado a pH 7.4 con KOH 1 M, conteniendo sacarosa al 1.4%, durante 5 min a t_a ambiente.

2.- Centrifugación a 1200 g, 15 min, continuando la fijación, a 4°C, hasta un tiempo total de 2 h 30 min.

3.- Lavados de los pellets, dos veces durante 30 min, en ácido oxálico 0.09 M con 7.5% de sacarosa.

4.- Postfijación en OsO₄ al 1% y 2% de piroantimoniato durante 2 h a 4°C.

5.- Lavados, durante 30 min, en agua destilada cuyo pH fue ajustado a 10 con KOH 0.1M.

6.- Deshidratación e inclusión.

b) Método Fosfato-piroantimoniato (PPA)

1.- Fijación, en un volumen igual al de la solución de plaquetas, en glutaraldehído al 3% en PO_4HK 0.09 M, ajustado a pH 7.4 con KOH 1 M y suplementado con 1.4% de sacarosa, durante 5 min a t_a ambiente.

2.- Centrifugación a 1200 g durante 15 min, para la obtención de pellet, prolongándose la fijación durante 2 h 30 min a t_a ambiente.

3.- Lavado de los pellets, dos veces durante 30 min, en $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.09 M con 7.5% de sacarosa.

4.- El resto del proceso es igual al método anterior (OPA)

Para observar la influencia del ión La^{3+} en la distribución del Ca^{2+} , una parte de las plaquetas fueron lavadas en solución de lavado (Anexo III) con cloruro de lantano 1mM, continuando el mismo protocolo.

Como controles de la especificidad del precipitado en las dos técnicas, tras la postfijación, los pellets fueron tratados durante 15 min con una solución de OsO_4 al 1% con 10 mM de ácido etilen-diamino tetraacético, (EDTA).

P-NITROFENILFOSFATASA DEPENDIENTE DE POTASIO (K^+ -pNPPasa) (Mayahara y cols., 1980).

- 1.- Fijación durante 30 min a t_a ambiente.
- 2.- Incubación durante 1 h a $30^\circ C$ en:
 - Tampón glicina-KOH pH 9 (glicina 250 mM, KOH 25 mM)
 - Citrato de plomo 4 mM en KOH 25 mM
 - Levamisole 2.5 mM
 - p-Nitrofenilfosfato (sal de magnesio) 10 mMAlgunos pellets fueron incubados en este medio conteniendo 25% de dimetilsulfóxido (DMSO).
- 3.- Lavados en tampón cacodilato, pH 7.3 0.1 M, con 230 mM de sacarosa, durante 2 h a $4^\circ C$.
- 4.- Postfijación en OsO_4 en tampón cacodilato pH 7.3 0.1 M, durante 30 min a $4^\circ C$.
- 5.- Deshidratación e inclusión.

Controles de esta técnica:

- Para demostrar la actividad p-NPPasa no dependiente de K^+ , la incubación se realizó en un medio similar al anteriormente descrito pero carente de K^+ , ya que el KOH de los tampones fue sustituido por NaOH.
- Adición de 10 mM de ouabaína a los dos distintos medios de incubación.
- Incubación en los dos medios anteriormente descritos pero carentes de sustrato.

ADENILATO CICLASA (cAMPasa)

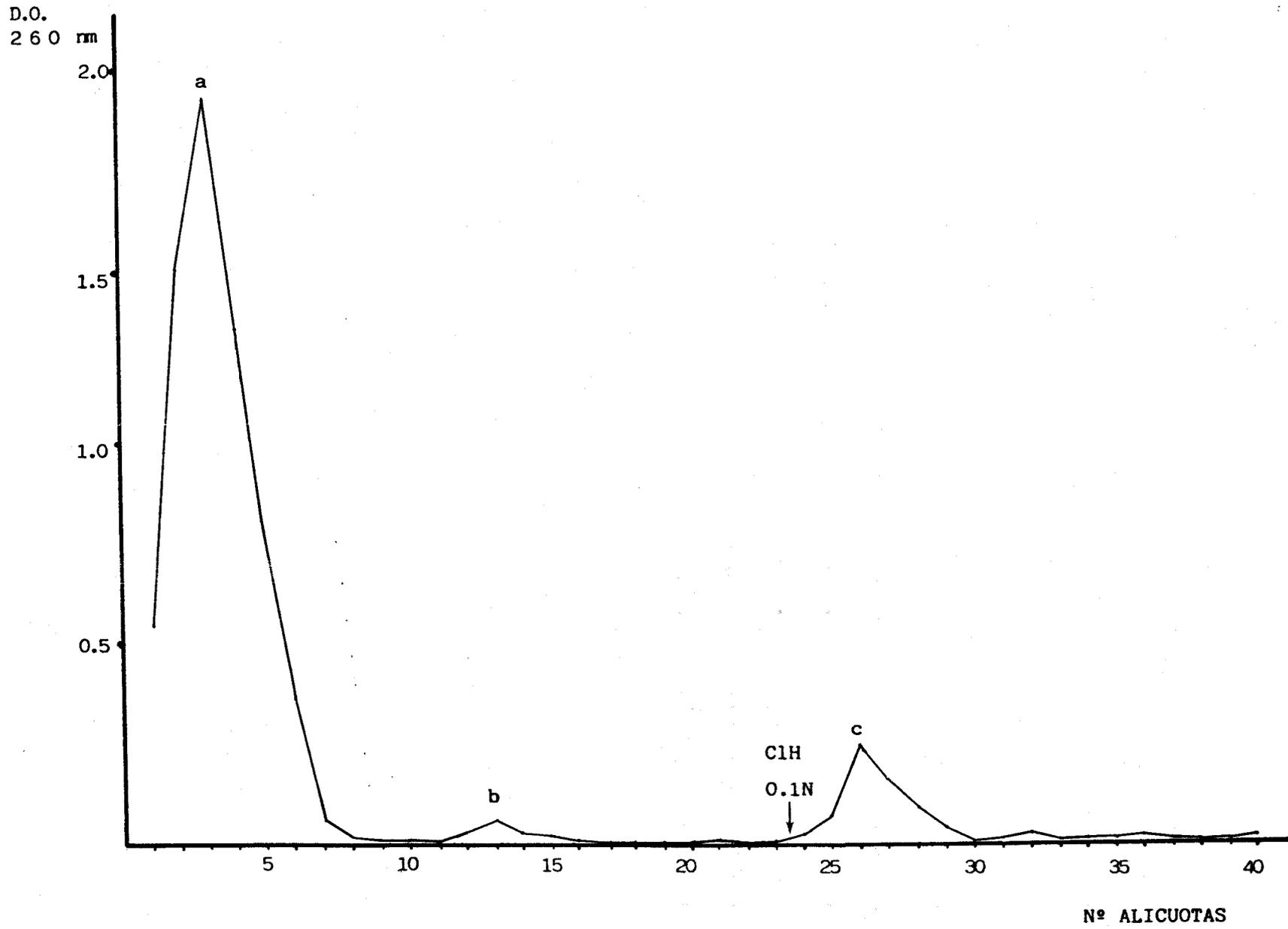
Purificación del sustrato

Para la realización de esta técnica citoquímica, el sustrato empleado, adenilimidodifosfato (App(NH)p) debe ser purificado antes de su uso, ya que los contaminantes que presenta pueden inducir a errores en el ensayo (Cutler y Christian, 1980). El producto (App(NH)p) de la casa comercial Sigma Chem. Co., con una pureza del 95% fué purificado a través de una columna catiónica Dowex AG-50W-X4 (1.0 x 4.0 cm).

Las diluciones fueron realizadas en agua destilada y se recogieron un total de 40 alícuotas de 0.5 ml. Entre las fracciones 23 y 24 se añadió 1 ml de ClH 1N para la elución de los contaminantes pegados a la columna. Las fracciones se midieron en un espectrofotómetro a 260 nm, realizándose la curva correspondiente a la variación de la absorbancia (Gráfica I). Las alícuotas 1 a 7 se mezclaron y diluyeron hasta obtener alícuotas de 1 ml, 2 mM, que se congelaron rápidamente a -20° C.

Adicionalmente se realizó una cromatografía en capa fina en celulosa de polietileneimida (PEI-celulosa) del producto, antes y después de su paso por la columna. PEI-celulosa (United States Biochem Corporation) se diluyó al 20% en agua destilada y se extendió con un grosor comprendido entre 0.1 - 0.2 mm en cristales de 20 x 10 cm.

GRAFICA I: Variaciones de la absorbancia a 260 nm de las alicuotas, elucionadas a través de una columna Dowex AG 50W-X4 de App(NH)p. a: pico de App(NH)p purificado. b: primer pico de impurezas. c: segundo pico de impurezas producido tras la adición de ClH 0.1 N.



Posteriormente a su secado, las placas fueron lavadas en agua destilada y nuevamente dejadas a secar una noche. Se colocaron pequeñas gotas del producto a una distancia de 1.5 cm. La cromatografía se desarrolló en cloruro de litio al 1.2 M como fase móvil y se revelaron, una vez secadas, con luz ultravioleta a 250 nm (Esquema II).

Método citoquímico

- 1.- Fijación durante 30 min a t_a ambiente.
- 2.- Incubación durante 30 min a 37°C en tres métodos de reacción diferentes:

a) Medio Cutler y cols, 1981.

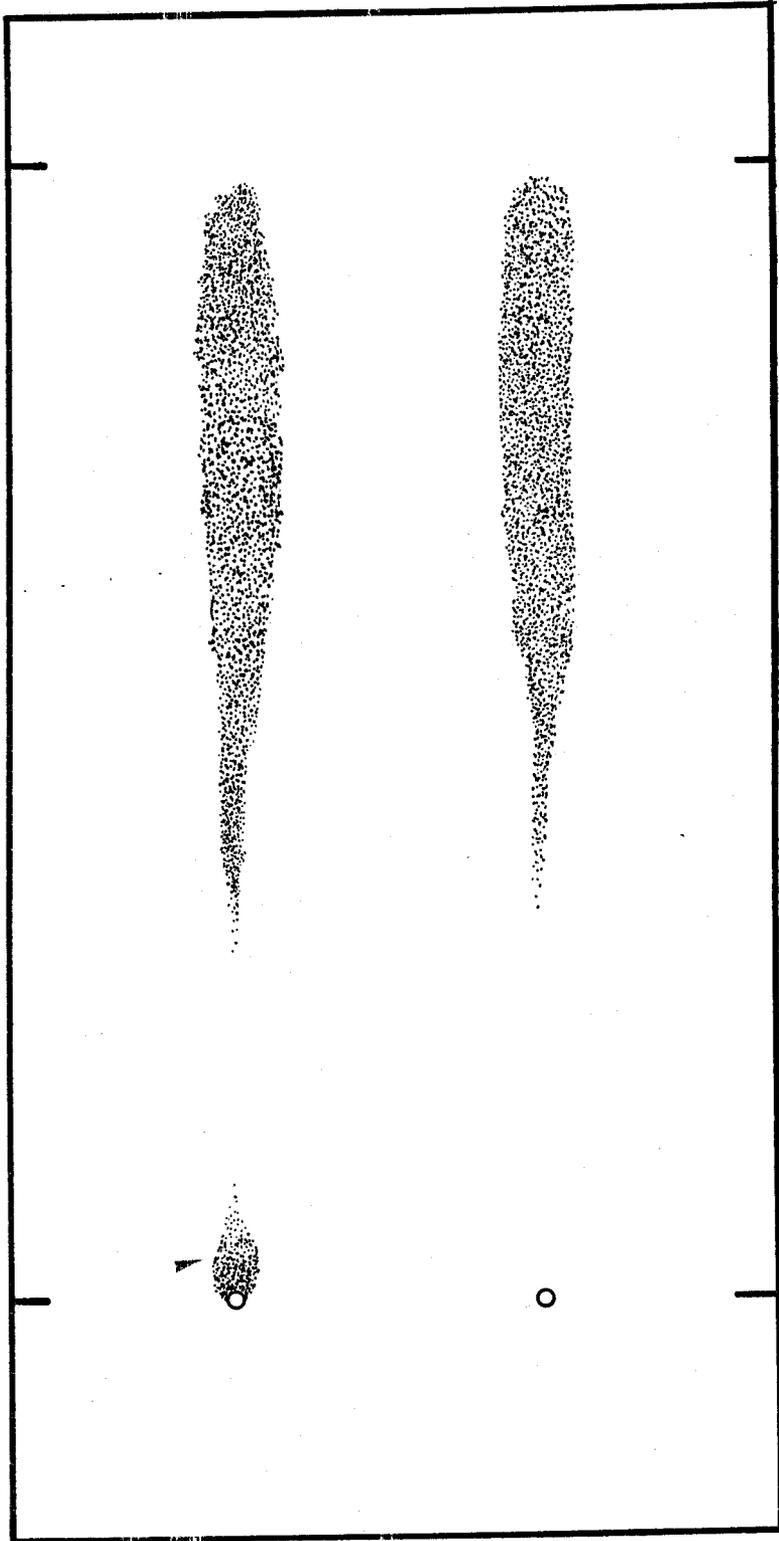
Es una variación del realizado por Ernst (1972a,b) para la evaluación de la actividad p-Nitrofenilfosfatasa- K^+ .

| | |
|------------------------|---------------|
| Cl_2Mg | 5 mM |
| Cl_2Sr | 10 mM |
| Teofilina | 10 mM |
| App(NH)p | 1 mM |
| Tris-ClH | 0.1 M, pH 8.7 |

- Lavados en el mismo tampón

- Conversión del complejo estroncio-imidodifodifosfato por inmersión de los pellet en NO_3Pb al 2% en tampón cacodilato 0.2M, pH 7.2, durante 20 min.

ESQUEMA II: Esquematización de la cromatografía desarrollada en cloruro de litio del producto App(NH)p , antes y después de su purificación en la columna Dowex AG 50W-X4. Impurezas contenidas en el producto original.



FIN

INICIO

b) Medio Cutler y cols., 1985

| | |
|----------------------------|---------------|
| Cl ₂ Mg | 5 mM |
| FNa | 5 mM |
| Teofilina | 10 mM |
| NO ₃ Pb | 1 mM |
| App(NH)p | 1 mM |
| Tris-maleato | 0.1 M, pH 7.2 |
| Lavados en el mismo tampón | |

c) Medio b modificado. En este caso, el medio de Cutler y cols (1985) lo adaptamos a las condiciones de pH utilizada por Ando y cols (1981) para la detección de la actividad ATPasa-Ca²⁺.

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| Cl ₂ Mg | 5 mM |
| FNa | 5 mM |
| Teofilina | 10 mM |
| App(NH)p | 1 mM |
| Citrato de plomo | 4 mM en NaOH 25 mM |
| Tampón glicina-NaOH, pH 9 | (Glicina 250 y NaOH 25 mM) |
| Lavados en el mismo tampón | |

Para estimular la actividad cAMPasa en las plaquetas se añadió en todos los casos:

| | |
|--|--------|
| PGE ₁ | 1 μM |
| PGD ₂ | 1 μM |
| Forskolina | 100 μM |
| PGE ₁ 1 μM + PGD ₂ 1 μM | |
| Forskolina 10 μM + PGE ₁ 1 μM + PGD ₂ 1 μM | |

Como controles de esta técnica se realizaron:

- Preincubación con 2 IU de trombina durante 5 min y posterior incubación en los medios anteriormente descritos pero conteniendo 2 IU de trombina.
- Incubación en los medios con estimuladores a los que se les añadió alloxan 10 mM.

- Incubación en los medios anteriores con estimuladores y carentes de sustrato.

3.- Postfijación en OsO_4 al 1 % en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2, durante 30 min a 4°C.

4.- Deshidratación e inclusión.

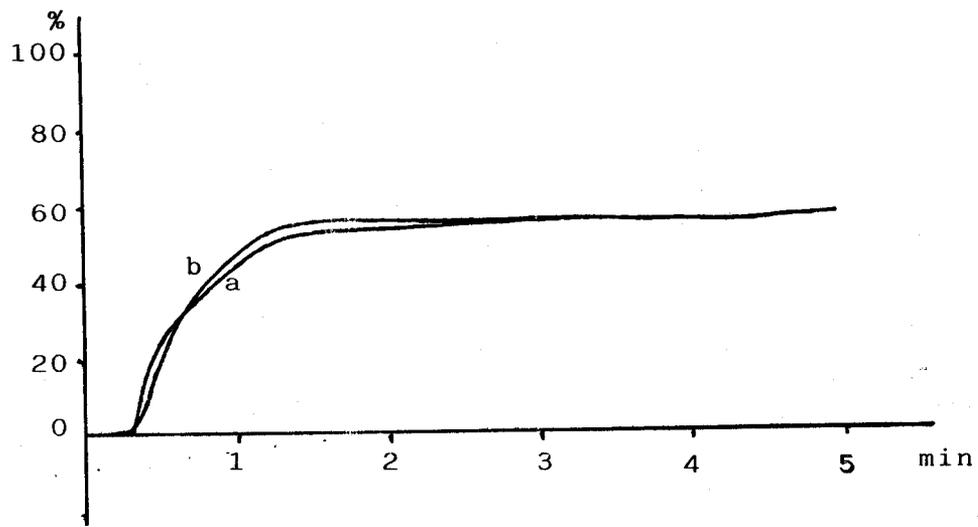
RESULTADOS

El aislamiento de las plaquetas, tal como se describe en el apartado correspondiente, fue inicialmente llevado a cabo mediante dos procedimientos: aislamiento simplemente del plasma citratado rico en plaquetas (sin lavar) y aislamiento tras un proceso de lavado (lavadas). La valoración inicial de los mismos se abordó realizando una prueba de agregación con diversos agentes agregantes: ADP, trombina, epinefrina y ácido araquidónico. En las gráficas II, III, IV y V, puede apreciarse que apenas existen diferencias entre las distintas curvas de agregación obtenidas, en función de los dos métodos de aislamiento ensayados. En todos los casos, los niveles de agregación observados pueden considerarse normales con respecto a curvas estandars.

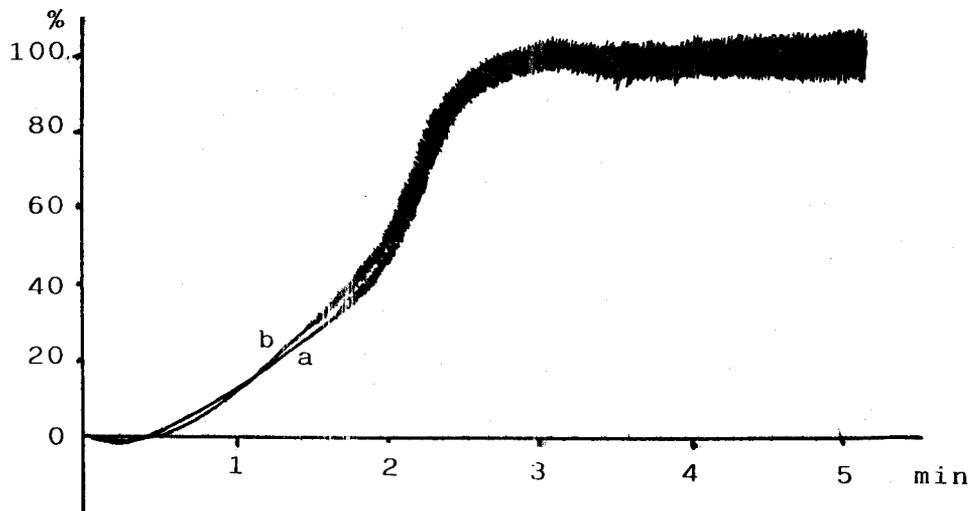
MORFOMETRIA Y ESTEREOLOGIA

Los datos que presentamos en este apartado fueron obtenidos a partir de muestras procesadas para M.E. de forma convencional. De ellas, se obtuvieron secciones finas que,

GRAFICAS II Y III: Representación gráfica del porcentaje de agregación (%) de las plaquetas con respecto al tiempo (min), tras la adición de ADP y Trombina, respectivamente. a: Agregación de plaquetas en PRP-citratado. b: Agregación de plaquetas en tampón de reacción tras previo lavado.

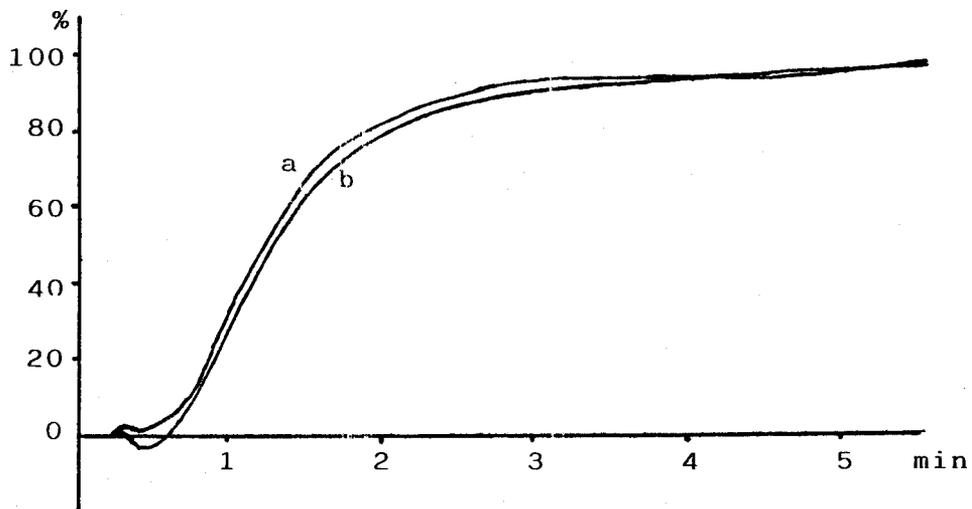


ADP (3.0 μM)

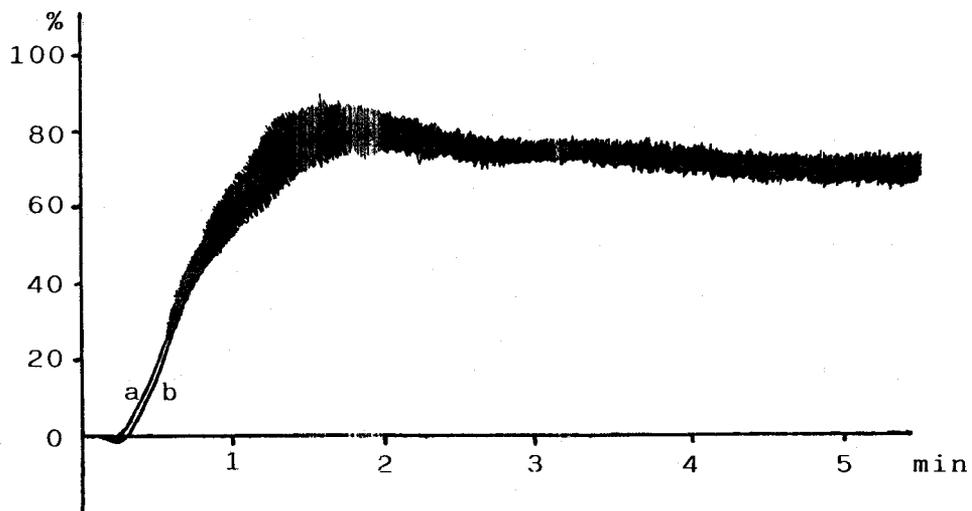


TROMBINA (0.1 IU)

GRAFICAS IV Y V: Representación gráfica del porcentaje de agregación (%) de las plaquetas con respecto al tiempo (min), tras la adición de Epinefrina y Ac. Araquidónico, respectivamente. a: Agregación de plaquetas en PRP-citratado. b: Agregación de plaquetas en tampón de reacción, tras previo lavado.



EPINEFRINA (2 µg/ml)



AC. ARAQUIDONICO (500 µg/ml)

trás contrateñirlas, fueron fotografiadas a 21.000 y 35.000 aumentos, correspondientes a los dos estudios realizados.

Los resultados morfométricos revelan que, entre las muestras procedentes de cada uno de los dos métodos de aislamiento ensayados (plaquetas lavadas y sin lavar), existen diferencias significativas ($p < 0.01$) en el área de sección, longitud del eje mayor y menor y superficie plaquetaria. También se pueden observar variaciones aunque sin significación estadística, entre otros parámetros morfométricos como son el perímetro de sección y el volumen (Tabla I). Se aprecian además diferencias comparativas ($p < 0.01$) en las razones entre ejes, con valores de 0.518 ± 0.002 y 0.375 ± 0.005 respectivamente (Gráfica VI) para plaquetas no lavadas y lavadas antes de su fijación.

Paralelamente, y según los valores estereológicos obtenidos, sólo se aprecian diferencias estadísticamente significativas en las densidades de volumen y superficie del Sistema Canalicular Conectado a Superficie (SCCS), así como en la densidad numérica de las mitocondrias. En concreto, los valores de estos parámetros son mayores en las plaquetas lavadas que en las no lavadas (Tabla II).

Podemos destacar que, en las plaquetas no lavadas, el 16.7% de la superficie en contacto con el medio externo se

TABLA I
METODO DE AISLAMIENTO

| | <u>SIN LAVAR</u> | <u>LAVADAS</u> |
|------------------|------------------|------------------------------|
| Area sección*... | 2.116 ± 0.0627 | 1.751 ± 0.0578 ¹ |
| Perímetro*..... | 7.113 ± 0.1255 | 6.878 ± 0.1269 |
| Long. menor*... | 1.211 ± 0.0233 | 0.944 ± 0.0205 ¹ |
| Long. mayor*... | 2.335 ± 0.0356 | 2.519 ± 0.0222 ¹ |
| Volumen***..... | 3.836 ± 0.1617 | 3.628 ± 0.1700 |
| Superficie**.... | 10.147 ± 0.2897 | 11.436 ± 0.3740 ¹ |

Unidades:

* μm ; ** μm^2 ; *** μm^3

TABLA II
METODO DE AISLAMIENTO

| | <u>SIN LAVAR</u> | <u>LAVADAS</u> |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|
| GRANULOS α | | |
| Vv..... | 0.132 ± 0.0064 | 0.121 ± 0.0045 |
| Sv..... | 2.688 ± 0.7242 | 2.448 ± 0.0985 |
| Nv..... | 12.517 ± 0.7242 | 11.930 ± 0.6700 |
| GRANULOS DENSOS | | |
| Vv..... | 0.012 ± 0.0048 | 0.008 ± 0.0012 |
| Sv..... | 0.242 ± 0.0662 | 0.203 ± 0.0271 |
| Nv..... | 1.435 ± 0.3266 | 1.300 ± 0.1727 |
| MITOCONDRIAS | | |
| Vv..... | 0.022 ± 0.0031 | 0.026 ± 0.0024 |
| Sv..... | 0.424 ± 0.0472 | 0.489 ± 0.0457 |
| Nv..... | 1.495 ± 0.1427 | 1.969 ± 0.2034 ² |
| SCCS | | |
| Vv..... | 0.025 ± 0.0031 | 0.050 ± 0.0060 ¹ |
| Sv..... | 0.529 ± 0.0495 | 1.121 ± 0.1041 ¹ |
| DTS | | |
| Vv..... | 0.063 ± 0.0051 | 0.067 ± 0.0062 |
| Sv..... | 4.300 ± 0.0495 | 3.891 ± 0.2835 |

Unidades: Vv $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$; Sv $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$; Nv $\mu\text{m}^0/\mu\text{m}^3$

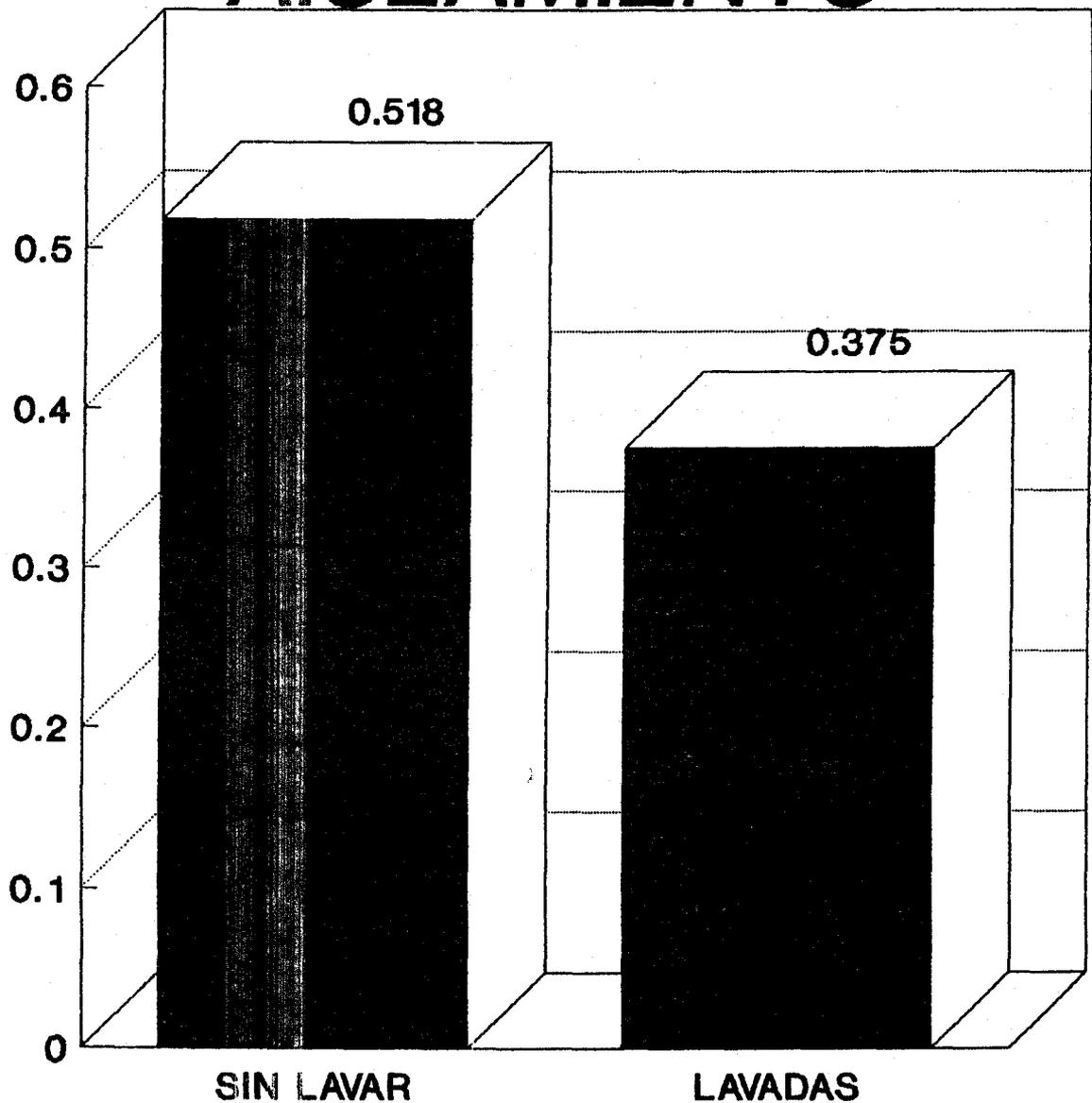
¹ p<0.01

² p<0.05

GRAFICA VI: Representación de las relaciones entre ejes (rp) de los dos métodos de aislamiento (plaquetas lavadas y sin lavar).

GRAFICA VI

AISLAMIENTO



■ rp

rp= long. eje menor / long. eje mayor

debe al SCCS mientras que en las plaquetas lavadas el SCCS representa el 26.2%.

Los datos morfométricos determinados tras la serie experimental del comportamiento de las plaquetas frente a distintos fijadores se muestran en la Tabla III. Para cada caso, las razones obtenidas entre la longitud de los ejes menor y mayor (r_p) son las siguientes (Gráfica VII):

Fij. A, $r_p = 0.324 \pm 0.005$

Fij. B, $r_p = 0.338 \pm 0.005$

Fij. C, $r_p = 0.311 \pm 0.006$

En relación a los distintos métodos de fijación empleados, existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos morfométricos. Al comparar el fijador A con los otros dos (B, C) estas diferencias se observan en todos los parámetros plaquetarios considerados. Asimismo, se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre la r_p de las plaquetas fijadas con los distintos métodos (A, B y C) y la de las plaquetas inicialmente empleadas para observar el comportamiento de las mismas frente al proceso de aislamiento comentado anteriormente.

Los valores estereológicos comparativos de los distintos métodos de fijación (Tabla IV), revelan que no existen diferencias entre los métodos de fijación B y C. No

TABLA III
METODO DE FIJACION

| | <u>WHITE (A)</u> | <u>PASTCHEKE (B)</u> | <u>GLUTARALD. (C)</u> |
|---------------|------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Area sección* | 1.680 ± 0.0382 | 1.953 ± 0.0408 ¹ | 2.066 ± 0.0704 ¹ |
| Perímetro*... | 6.006 ± 0.0649 | 6.581 ± 0.0547 ¹ | 6.839 ± 0.0821 ^{1/2} |
| Long. menor* | 0.912 ± 0.0151 | 1.005 ± 0.0155 ¹ | 0.967 ± 0.0235 ¹ |
| Long. mayor* | 2.827 ± 0.0299 | 2.981 ± 0.0260 ¹ | 3.110 ± 0.0362 ^{1/2} |
| Volumen***... | 3.912 ± 0.1177 | 4.740 ± 0.1193 ¹ | 5.136 ± 0.2325 ¹ |
| Superficie**. | 13.341 ± 0.2743 | 14.796 ± 0.2453 ¹ | 16.177 ± 0.3851 ^{1/2} |

Unidades:

* μm ; ** μm^2 ; *** μm^3

TABLA IV
METODO DE FIJACION

| | <u>WHITE (A)</u> | <u>PASTCHEKE (B)</u> | <u>GLUTARALD. (C)</u> |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|
| GRANULOS α | | | |
| Vv... | 0.141 ± 0.0127 | 0.097 ± 0.0090 ¹ | 0.089 ± 0.0096 ¹ |
| Sv... | 3.891 ± 0.3318 | 2.898 ± 0.2541 ² | 2.463 ± 0.2221 ¹ |
| Nv... | 34.215 ± 3.3352 | 30.138 ± 3.4190 | 26.913 ± 2.4922 ² |
| GRANULOS DENSOS | | | |
| Vv... | 0.035 ± 0.0038 | 0.016 ± 0.0017 ¹ | 0.019 ± 0.0022 ¹ |
| Sv... | 0.893 ± 0.1289 | 0.555 ± 0.0093 ¹ | 0.531 ± 0.0675 ¹ |
| Nv... | 7.518 ± 1.4712 | 3.609 ± 1.0042 ¹ | 3.781 ± 0.6358 ¹ |
| MITOCONDRIAS | | | |
| Vv... | 0.037 ± 0.0052 | 0.034 ± 0.0043 | 0.035 ± 0.0035 |
| Sv... | 0.857 ± 0.1192 | 0.776 ± 0.0894 | 0.770 ± 0.0935 |
| Nv... | 4.932 ± 0.4783 | 5.891 ± 0.6847 | 5.436 ± 0.5650 |
| SCCS | | | |
| Vv... | 0.142 ± 0.0140 | 0.098 ± 0.0103 ² | 0.101 ± 0.0098 ² |
| Sv... | 4.261 ± 0.3941 | 3.601 ± 0.3302 | 3.529 ± 0.2617 |
| DTS | | | |
| Vv... | 0.060 ± 0.0045 | 0.056 ± 0.0056 | 0.058 ± 0.0062 |
| Sv... | 6.703 ± 0.3836 | 7.582 ± 0.5869 | 7.598 ± 0.5790 |

Unidades: Vv $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$; Sv $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$; Nv $\mu\text{m}^0/\mu\text{m}^3$

¹ p<0.01 con respecto a A

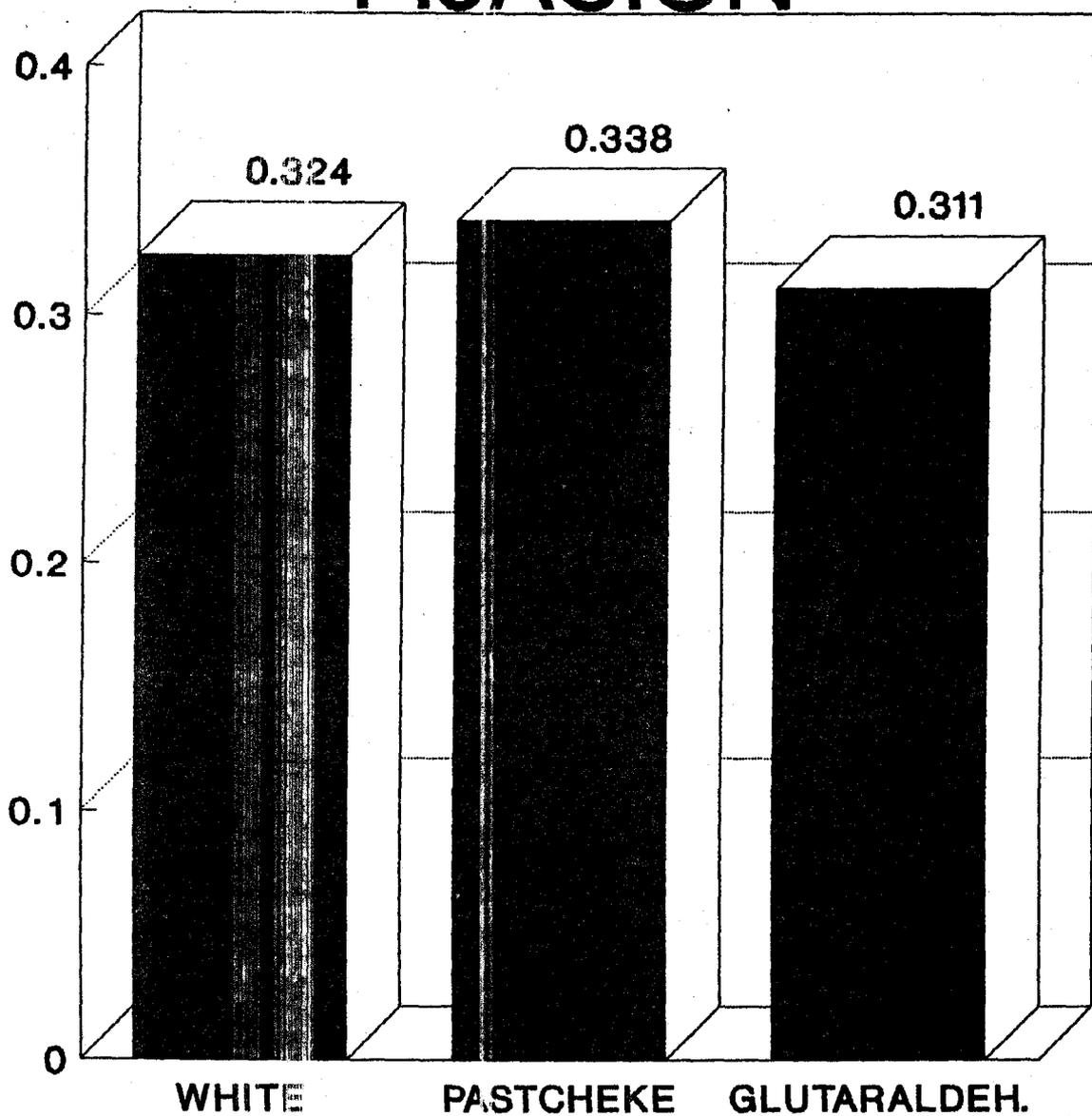
² p<0.05 con respecto a A

³ p<0.01 con respecto a B

GRAFICA VII: Representación de las relaciones entre ejes
(rp) de los tres métodos de fijación utilizados.

GRAFICA VII

FIJACION



■ rp

rp= long. eje menor / long. eje mayor

obstante, las muestras fijadas según estos dos protocolos si tienen diferencias significativas con respecto a las fijadas según A, en lo que se refiere a la densidad de volumen (Vv) y densidad de superficie (Sv) de los gránulos α , todos los parámetros de los gránulos densos y la densidad de volumen (Vv) del SCCS. Es más, la fijación según C también mostró diferencias significativas en la densidad numérica (Nv) de gránulos α con respecto al método A. Asimismo, todos estos datos son significativamente diferentes a los obtenidos con el fijador utilizado en el protocolo anterior (plaquetas lavadas), realizado para observar las diferencias existentes según el método de aislamiento, a excepción de la densidad de volumen (Vv) del DTS (comparar tabla II y IV).

En las gráficas VIII y IX están expresados los porcentajes de volúmenes ocupados por los compartimentos celulares, en plaquetas fijadas según los tres procedimientos.

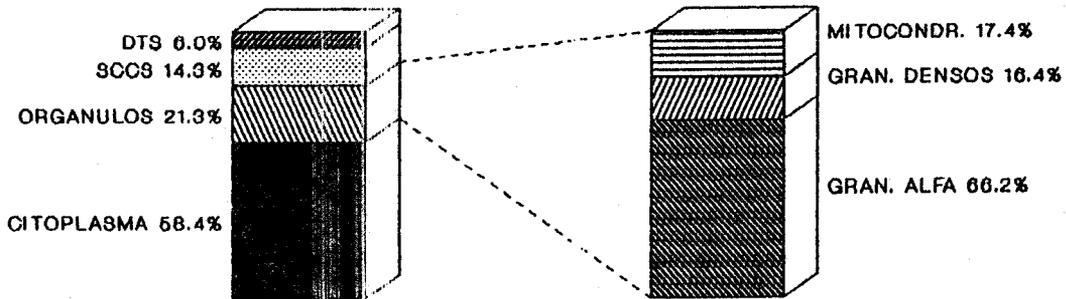
Por su parte, en las gráficas X y XI se representa la superficie externa que presenta la plaqueta y la que puede externalizar tras un proceso que conlleve su activación (SCCS, DTS, gránulos α , gránulos densos). De toda ella, sólo de un 37 a un 40% se encuentra en contacto directo con el medio externo, en la forma inactivada de la plaqueta.

De la superficie en contacto directo con el medio externo en estos discocitos (plaquetas en su estado inac-

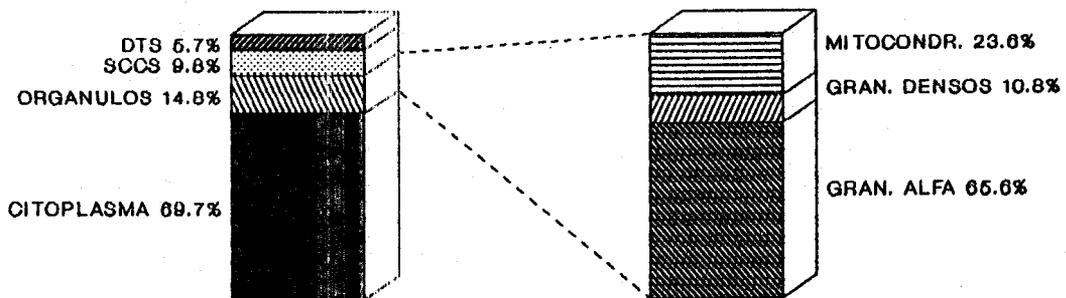
GRAFICA VIII: Repartición proporcional del volumen plaquetario entre sus distintos componentes, según los resultados obtenidos con los fijadores A (White) y B (Pastcheke). En la barra derecha aparece dividido el porcentaje de volumen de los orgánulos según sus distintos componentes.

GRAFICA VII

VOLUMEN



WHITE

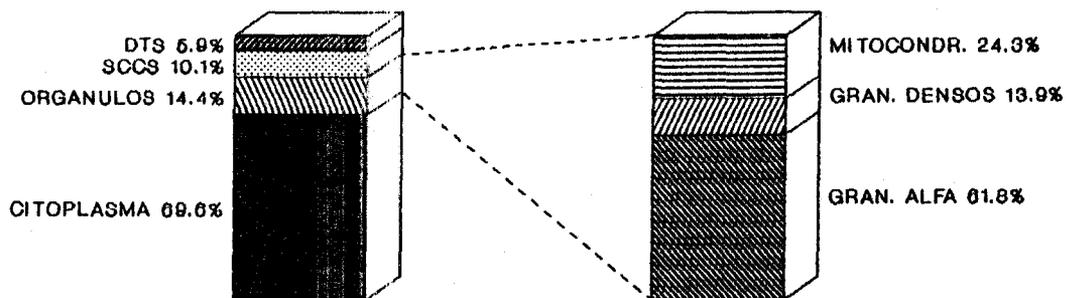


PASTCHEKE

GRAFICA IX: Gráfica semejante a la anterior en la que se muestra los resultados obtenidos con el fijador C (Glutaraldehído).

GRAFICA IX

VOLUMEN



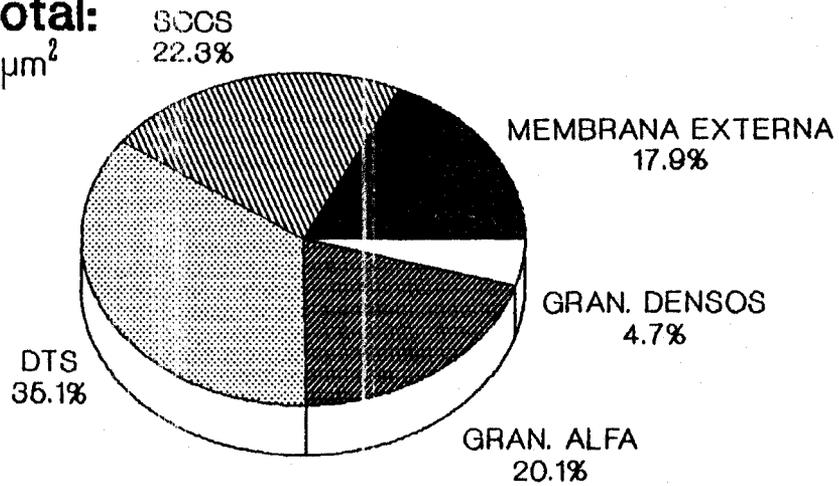
GLUTARALDEHIDO

GRAFICA X: Representación gráfica de la superficie externa (membrana externa) y la que se puede externalizar tras un proceso que conlleve su activación (SCCS, DTS, Gránulos α , Gránulos densos), en la plaquetas fijadas con el fijador A (White) y B (Pastcheke), respectivamente.

GRAFICA X

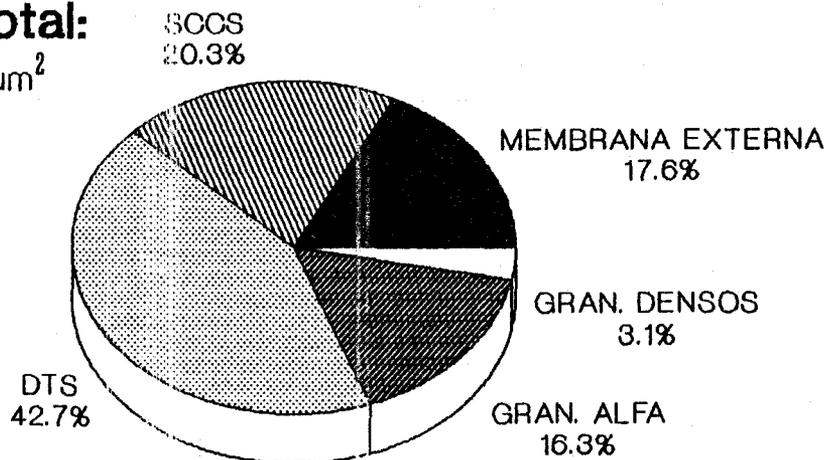
SUPERFICIE

Sup. Total:
74.69 μm^2



WHITE

Sup. Total:
84.16 μm^2



PASTCHIEKE

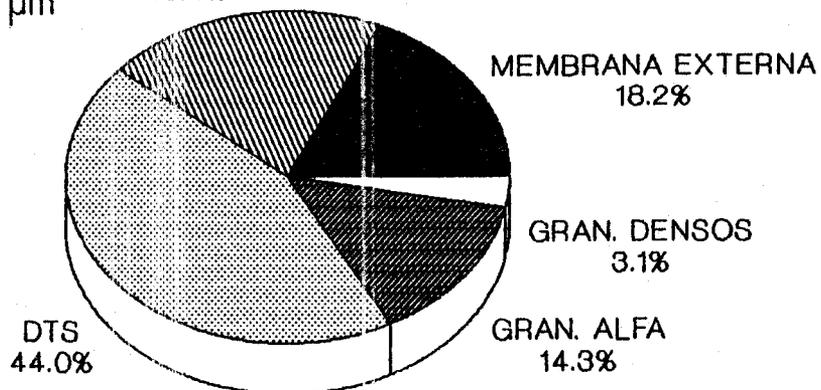
GRAFICA XI: Gráfica semejante a la anterior en la que se muestra los resultados obtenidos con el fijador C (Glutaraldehido).

GRAFICA XI

SUPERFICIE

Sup. Total:
88.69 μm^2

SCCS
20.4%



GLUTARALDEHIDO

tivado), el 55.5%, 53.5% y 52.8% está representada por el SCCS con los fijadores A, B y C, respectivamente. En la gráfica XII se representa el número total de orgánulos (gránulos α , gránulos densos y mitocondrias) por plaquetas según los distintos métodos de aislamiento.

ULTRAESTRUCTURA

El examen ultraestructural de las plaquetas objeto del estudio comparativo entre los dos métodos de aislamiento (lavadas y sin lavar) revela la presencia de pseudópodos en algunas de las numerosas secciones celulares que se observa en cada corte (fig. 1a). Tanto en las plaquetas lavadas como sin lavar aparecen secciones correspondientes a planos de corte longitudinales y transversales (Fig. 1b).

Al comparar las características ultraestructurales de las plaquetas sometidas a cada uno de los métodos de aislamiento empleados, sólo hemos encontrado variación en el Sistema Canalicular Conectado a Superficie (SCCS), el cual aparece más dilatado en las muestras lavadas que en las no lavadas (Comparese las figs. 1b, 1c). Sin embargo, no hemos apreciado diferencias cualitativas manifiestas entre las plaquetas sometidas a los distintos procesos de fijación. En general pues, la organización subcelular de las plaquetas está en todos los casos bien conservada.

GRAFICA XII: Representación en barras del número de orgánulos por plaquetas en los tres fijadores utilizados.

GRAFICA XII

NUMERO DE ORGANULOS/PLAQUETA

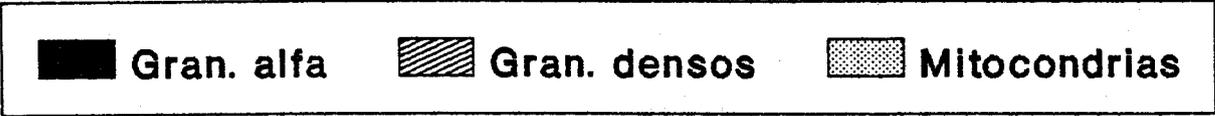
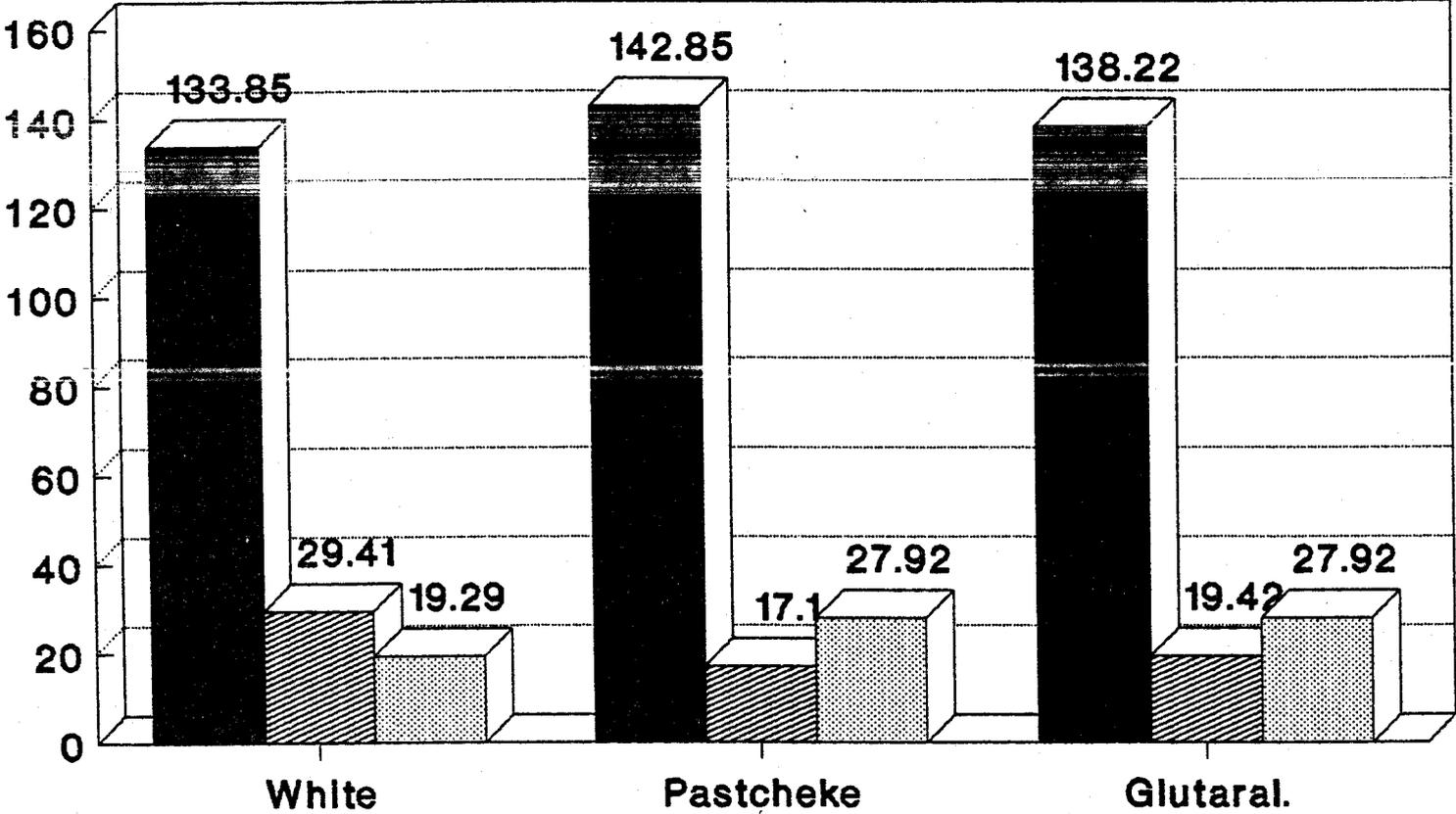
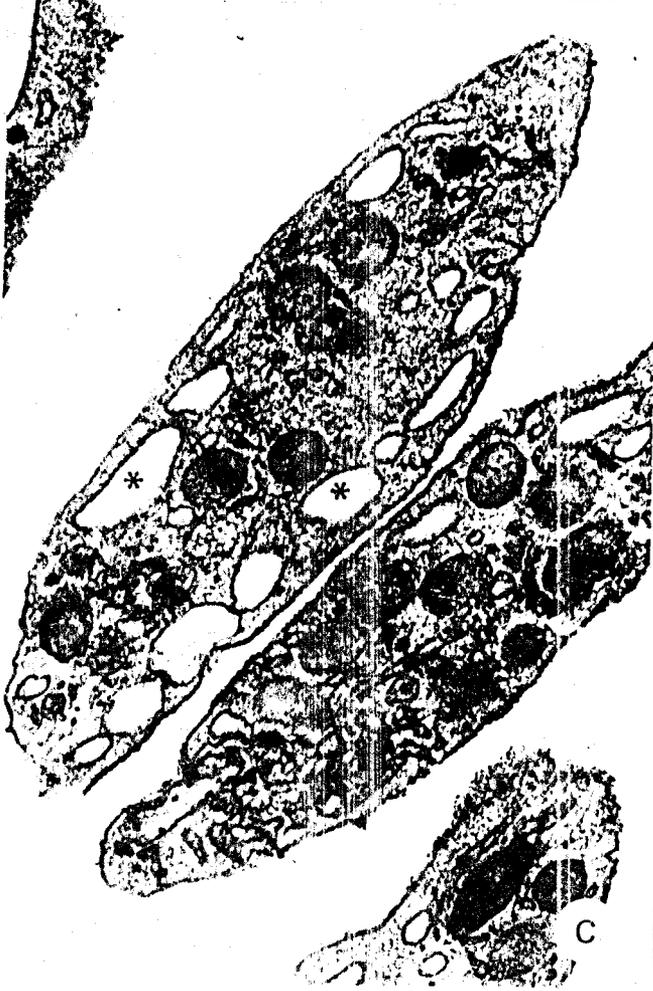
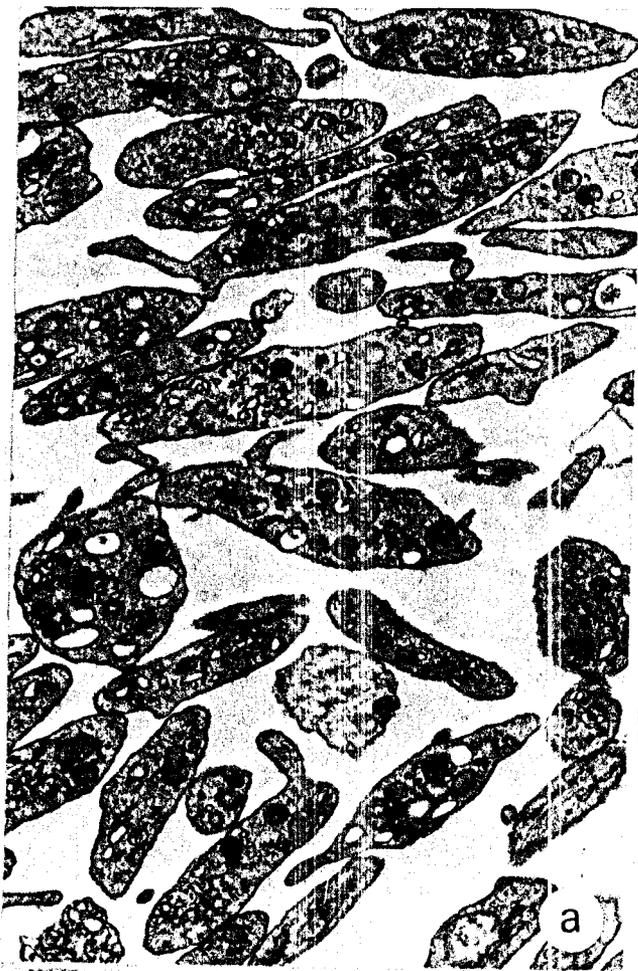


FIGURA 1: Características ultraestructurales de plaquetas aisladas según los dos protocolos realizados (con previo lavado antes de su fijación y sin él).

- a: Visión general de numerosas secciones plaquetarias aisladas mediante el proceso de lavado. Obsérvese la existencia de pseudópodos de distinto tamaño y longitud en alguna de ellas. (x 14.760).
- b: Secciones transversal y longitudinal correspondientes a plaquetas no lavadas. Nótese la presencia de numerosos gránulos α (GA), las escasas cisternas del Sistema Canalicular Conectado a Superficie (*) y la distribución del Sistema Tubular Denso (DTS). (x 34.800).
- c: Secciones transversales de plaquetas lavadas antes de su fijación. Nótese la dilatación del SCCS (*) con respecto a la anterior fotografía. GA gránulo α . (x 48.800).
- d: Plaqueta cortada longitudinalmente, en la que se aprecia la banda de microtúbulos (mt), los gránulos α (GA), túbulos del DTS y cisternas del SCCS (*). Entre la banda de microtúbulos y la membrana citoplasmática se encuentra la zona submembranosa (Z). (x 66.000).



La disposición que adopta la banda de microtúbulos característica de las plaquetas se muestra en la Fig. 1d. En las secciones longitudinales aparece sistemáticamente una zona carente de orgánulos, delimitada por la membrana plasmática y la banda de microtúbulos, que se corresponde con la denominada zona submembranosa. Los orgánulos contenidos en las plaquetas junto con los numerosos túbulos del Sistema Tubular Denso (DTS) y canales del SCCS se localizan en la región citoplásmica que delimita internamente a la banda de microtúbulos (Fig. 1d).

En algunas de las secciones, se aprecian las aperturas del SCCS al exterior (Figs. 2b, 2c) así como los complejos de membranas internos organizados entre el SCCS y DTS (Fig. 2d). Este último sistema se presenta como túbulos alargados que forman una red interior, la cual es especialmente notable en las zonas más periféricas de la plaqueta (Fig. 2e). De hecho es frecuente observar una estrecha relación entre el DTS y los microtúbulos (Fig. 2f).

De los distintos componentes celulares presentes en el citoplasma de las plaquetas, los gránulos α son los que aparecen en mayor número. Estos son de tamaño y opacidad electrónica variable e incluso en algunos de ellos se observan zonas claras de menor densidad (Figs. 1b, 1c). Los

FIGURA 2: Detalles ultraestructurales de plaquetas lavadas y fijadas con los tres fijadores probandos.

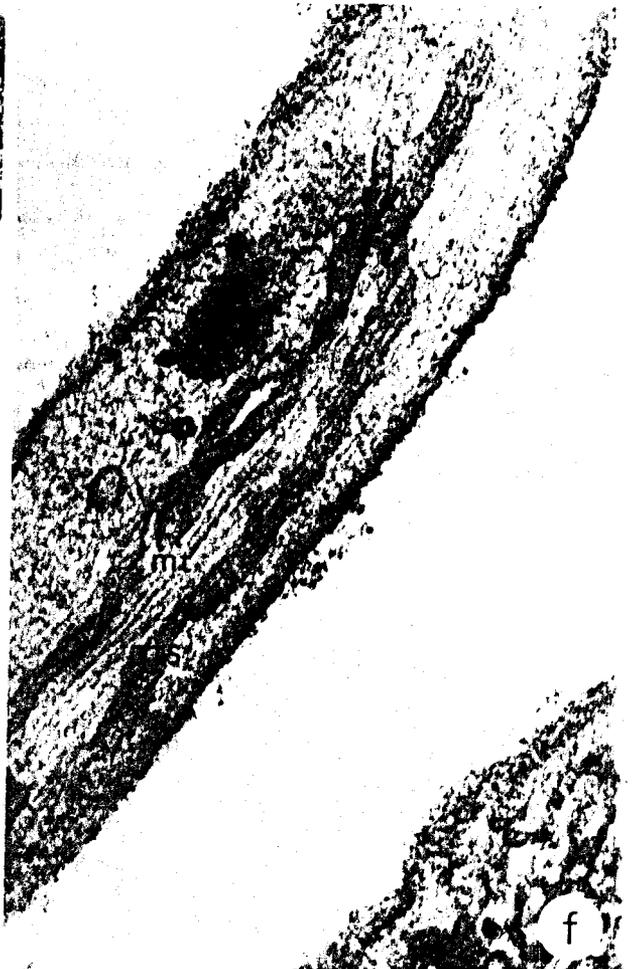
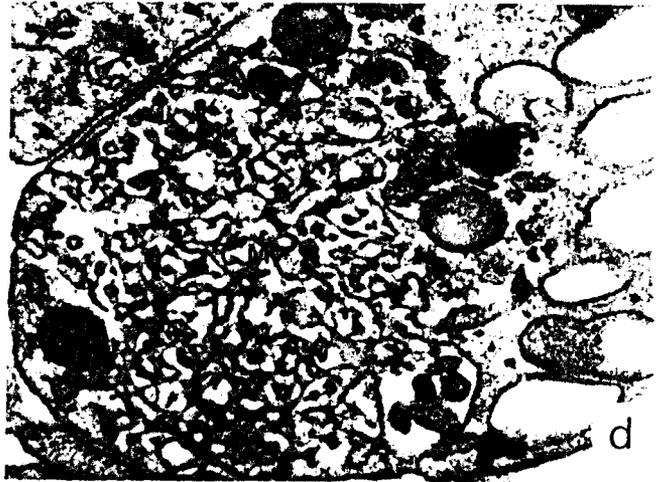
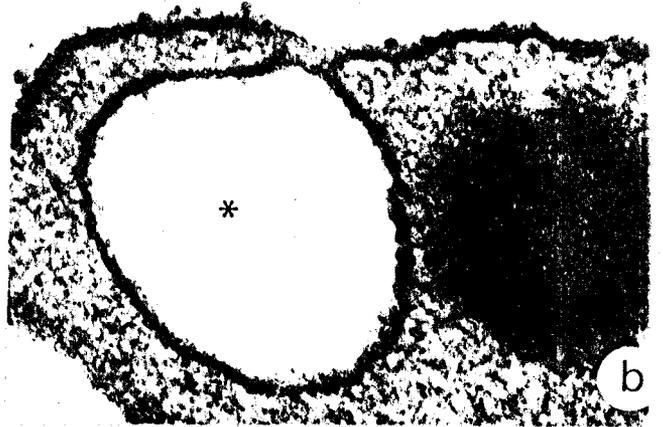
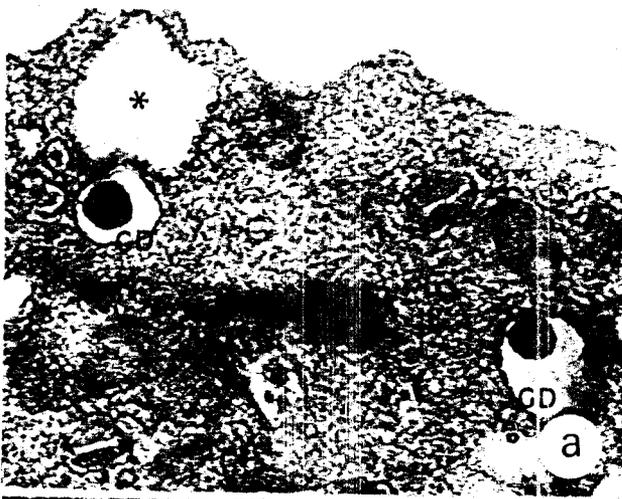
a: Gránulos densos con su típica morfología (GD). En ellos, podemos ver el núcleo altamente osmiófilo que se sitúa central ó periféricamente en el interior del gránulo. El resto del contenido del gránulo es electróntransparente. Nótese la proximidad de uno de ellos al SCCS (*). Fijador A. (x 86.460).

b,c: Aperturas del SCCS (*) al exterior de la plaqueta. Aislamiento mediante lavado y fijación en soluciones B y C, respectivamente. GA gránulos α . (x 177.600; 157.000).

d: Complejo de membrana (CM), formado por la asociación de canales de SCCS y túbulos de DTS. Plaquetas lavadas y fijadas con solución A. (x 79.200).

e: Sistema Tubular Denso (DTS) compuestos por túbulos ramificados dispuestos por toda la plaqueta. Fijador B. (x 94.000).

f: Corte transversal muy proximo a la periferia de la plaqueta, donde podemos observar la típica asociación del DTS y microtúbulos (mt). Fijador C. (104.000).



gránulos densos se reconocen y diferencian fácilmente de los gránulos α por presentar un núcleo altamente osmiófilo localizado en la región central o periférica del gránulo (Fig. 2a).

CITOQUIMICA

Los datos morfométricos y estereológicos revelan que las plaquetas aisladas con el proceso de lavado y fijadas a baja concentración de glutaraldehído (Fijador C) son las que muestran su estructura mejor conservada. Por ello, las distintas técnicas citoquímicas llevadas a cabo en el presente estudio han sido realizadas en plaquetas aisladas y fijadas según este protocolo.

Con la técnica del ácido peryódico - tiocarbohidrazida-proteinato de plata, utilizada para la detección de glicoconjugados con grupos vic-glicol y/o alfaaminoalcohol, no pudimos observar precipitado a nivel de la superficie plaquetaria. Sin embargo, esta misma técnica nos reveló la presencia de numerosos depósitos densos, correspondientes a glucógeno, tras un periodo de incubación de tiocarbohidrazida de 72 h.

Morfológicamente, las partículas de glucógeno se encuentran dispersas por el citoplasma (Fig. 3a) o bien agrupadas (Fig. 3b) en determinadas zonas del mismo; distribución similar a la observada citoquímicamente tras la aplicación de la técnica de Thiery. En tal sentido, el precipitado aparece distribuido uniformemente por todo el citoplasma (Fig. 3c) y, en ocasiones, forma grandes acúmulos (Fig. 3d). En la figura 3e, junto a la distinta intensidad del precipitado producido por las sales de plata, puede apreciarse la aparente disposición en forma β de las partículas de glucógeno. Asimismo, voluminosas partículas electrodensas rodean frecuentemente las cisternas del SCCS (Fig. 3f).

Disminuyendo el tiempo de tratamiento con tiocarbohidrazida a 48 h o 40 min se mantiene el mismo patrón de tinción, aunque menos intenso conforme disminuye el tiempo de incubación (Figs. 3g, 3h). En los controles realizados sin tratamiento con tiocarbohidrazida, no observamos ningún tipo de precipitado.

El método del hierro coloidal, utilizado para la demostración ultraestructural de cargas negativas, dió resultados positivos a nivel de toda la superficie externa de la plaqueta (Fig. 4c). Este fino precipitado, debido al marcaje de los grupos aniónicos de los glicoconjugados de la superficie celular, también se observan a nivel del SCCS

FIGURA 3: Propiedades morfológicas y citoquímicas del glucógeno en plaquetas.

- a: Sección de plaqueta en la que se observan acúmulos de glucógeno (g) de forma dispersa por todo el citoplasma y entre los numerosos gránulos alfa (GA). (x 60.000).
- b: Obsérvese la presencia de acúmulos de glucógeno (g) en una zona bien delimitada. GA gránulo α . (x 47.000).
- c: Precipitado de plata en el citoplasma de la plaqueta. Nótese la ausencia de tinción a nivel de la membrana plasmática. GA gránulo α . Sección contrateñida. (x 66.000).
- d: Sección contrateñida tras su incubación en la secuencia PA-TCH-Ag. Obsérvese la presencia de grandes acúmulos de glucógeno (x 42.800).
- e: Micrografía donde se aprecia el fino granulado producido por la precipitación de plata. (x 73.200).
- f: Asociación muy característica del glucógeno con el SCCS (*). (x 61.800).
- g: El tratamiento de carbohidrazida durante 48 h sigue produciendo el mismo tipo de precipitado. (x 35.000).
- h: Nótese la asociación directa del glucógeno con el SCCS (*) en una sección tratada durante 40 min. de tiocarbohidrazida. Obsérvese como el precipitado obtenido es algo más tenue. (x 72.500).
- i: Sección incubada con proteinato de plata sin tratamiento de tiocarbohidrazida. Nótese la ausencia de precipitado. (x 40.000).

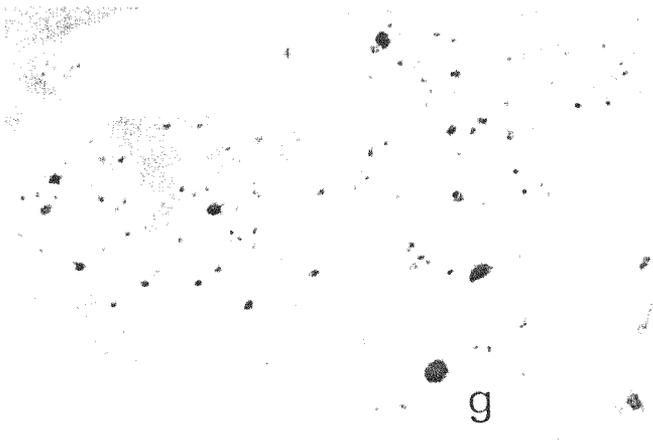
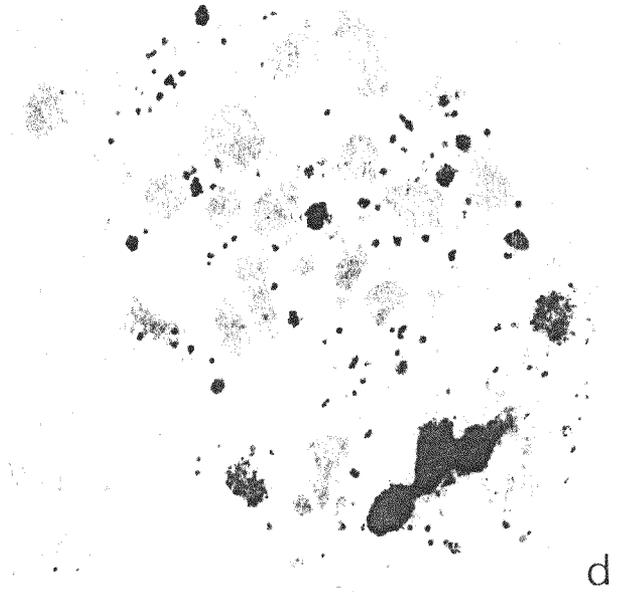
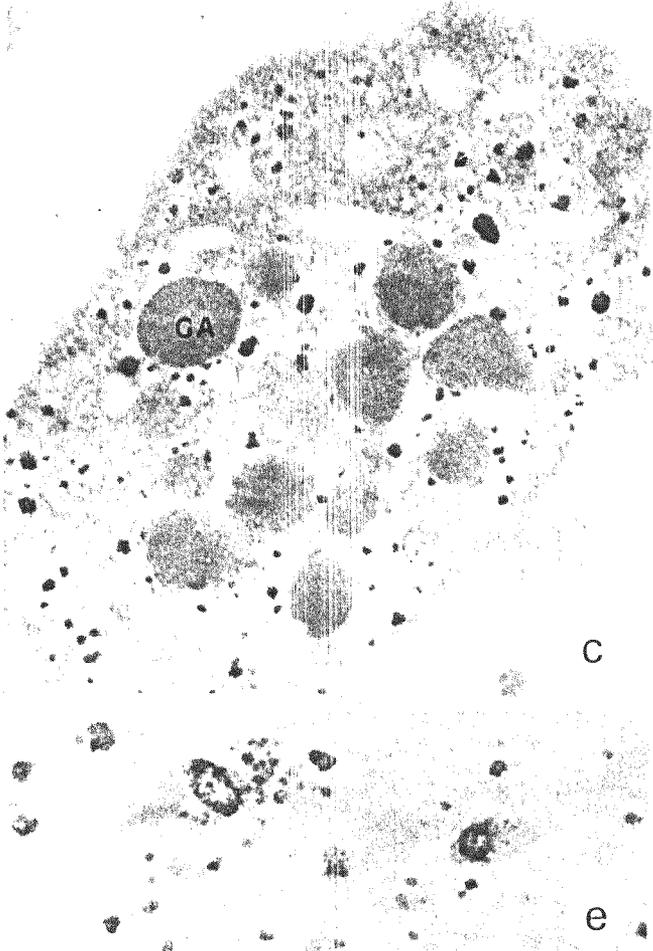
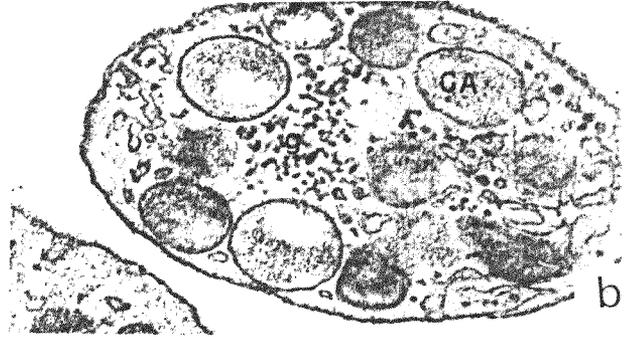
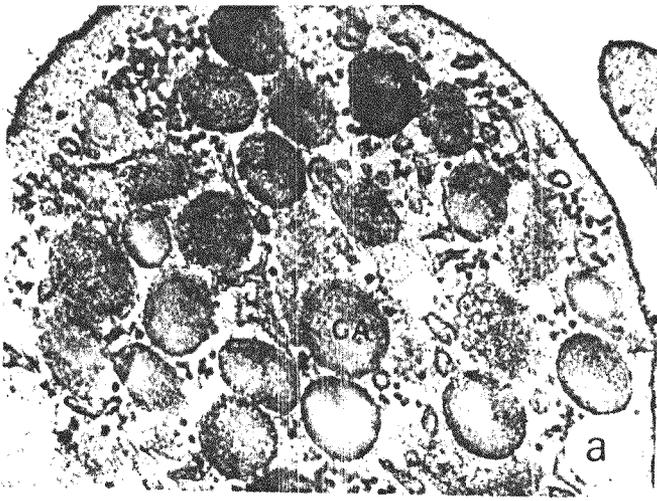
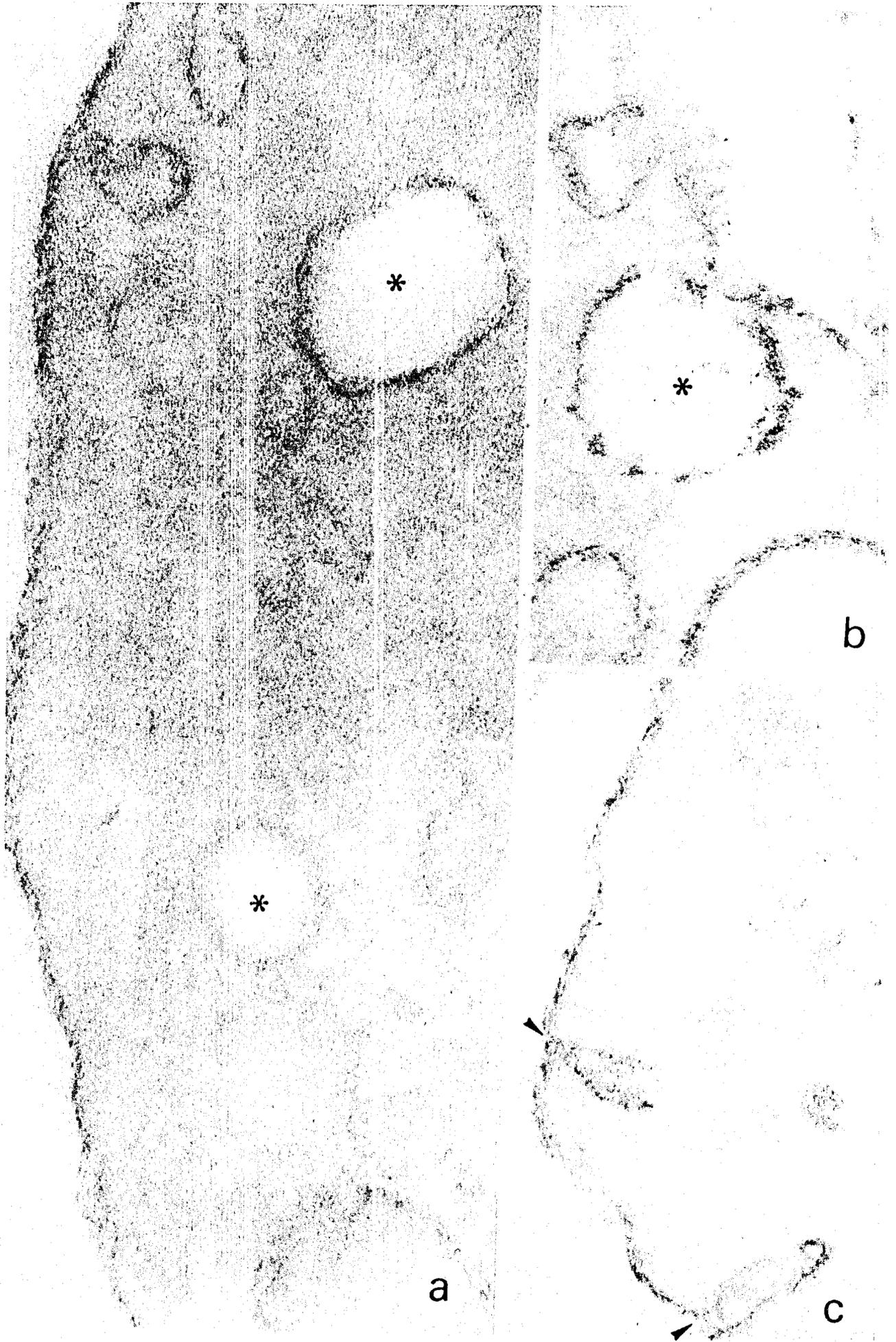


FIGURA 4: Secciones de plaquetas no contrateñidas, obtenidas tras la realización de la técnica del Hierro Coloidal, para la detección de cargas negativas.

a: Observese el fino precipitado de hierro sobre la membrana plasmática y el SCCS (*) con esta técnica (246.600).

b: Cisternas del SCCS (*) delimitadas por el producto de reacción. (x 216.000).

c: Con esta técnica las aberturas de SCCS (▲) a la superficie exterior de la plaqueta se hacen claramente visibles. (x 200.000).



(Figs. 4a, 4b). Con este método se puede apreciar claramente las aperturas de este sistema al exterior (Fig. 4c).

Para la valoración citoquímica del ión Ca^{2+} nos pareció adecuado utilizar uno de los métodos cuya fiabilidad se ha probado en el músculo esquelético y cardíaco (Borges y cols. 1984). El procedimiento se basa en la aplicación de dos técnicas independientes: una utiliza el oxalato y otra el fosfato para "atrapar" o estabilizar el calcio intracelular antes de su conversión en una sal de antimoniato.

La combinación del oxalato-piroantimoniato (OPA) produjo la precipitación de las sales de antimoniato en el DTS (Fig. 5a, 5d, 5e) y en el SCCS (Figs. 5b, 5c, 5d), mientras que la membrana plasmática apareció carente de precipitado. En los orgánulos citoplásmicos pudimos observar depósitos de antimoniato calcico en el nucleoide de los gránulos densos (Fig. 5e), en raras ocasiones en gránulos α (Fig. 5f) y en el interior de la matriz mitocondrial (Fig. 5g). El tratamiento previo de las plaquetas con el agente quelante EDTA evitó la aparición del precipitado anteriormente comentado, lo cual confirma la especificidad de esta técnica para la detección de calcio.

Por su parte, tras la combinación fosfato-piroantimoniato (PPA), aparecen acúmulos electrodensos en la membrana plasmática (Fig. 6a) y, de manera más intensa, en

FIGURA 5: Determinación del ión Ca^{2+} mediante la técnica del OPA. Secciones sin contrateñir.

- a: Nótese el precipitado de antimoniato Ca^{2+} a nivel del DTS y la ausencia de tinción a nivel de la membrana plasmática. (x 107.940).
- b: En esta micrografía podemos ver la presencia de reacción en las cisternas del SCCS (*). (x 51.200).
- c: Detalle de la distribución del precipitado a nivel de la cara externa del SCCS (*). (x 74.250).
- d: Micrografía en la cual se demuestra la tinción específica exhibida por el SCCS (*) y DTS (↓). (x 56.700).
- e: Obsérvese como el precipitado que se produce en el DTS (↑), se encuentra localizado a nivel de la cara interna de su membrana. GD gránulo denso. (x 66.000).
- f: Reactividad del nucleóide de un gránulo α (GA) frente a la aplicación de esta técnica. (x 102.600).
- g: Precipitado de antimoniato Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (x 130.000).
- h: Ausencia de reacción en una sección perteneciente a células preincubadas con EDTA previa a la realización de la técnica. (x 45.000).

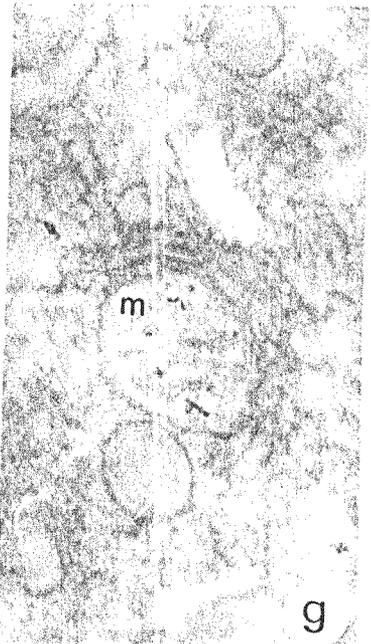
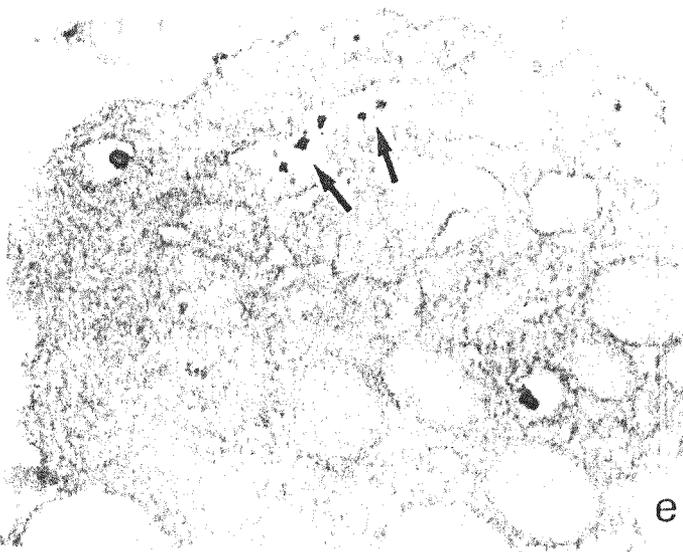
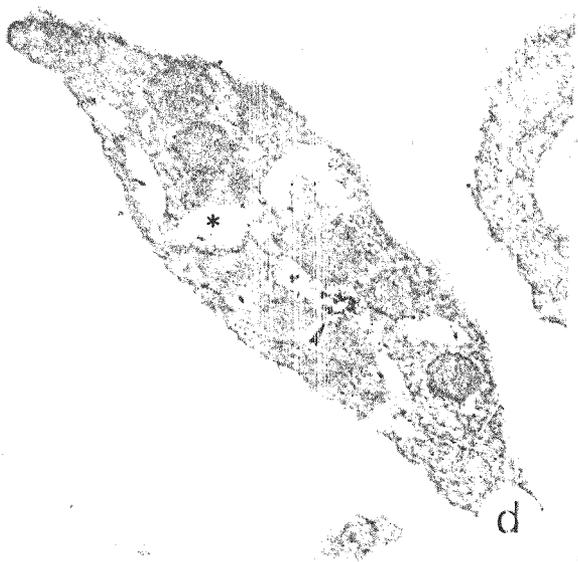
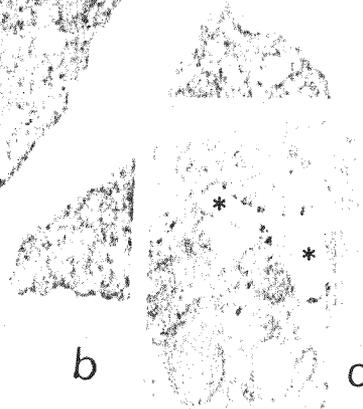
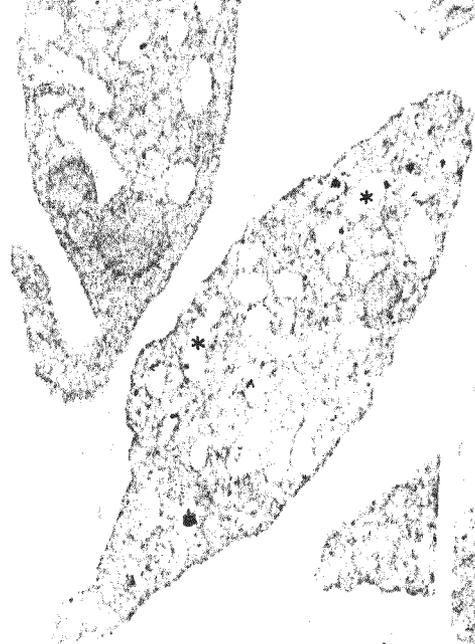
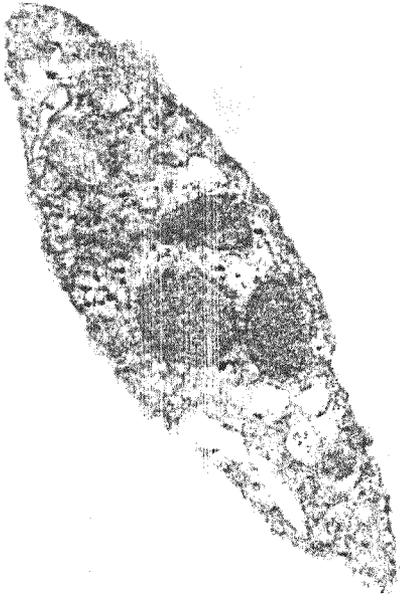
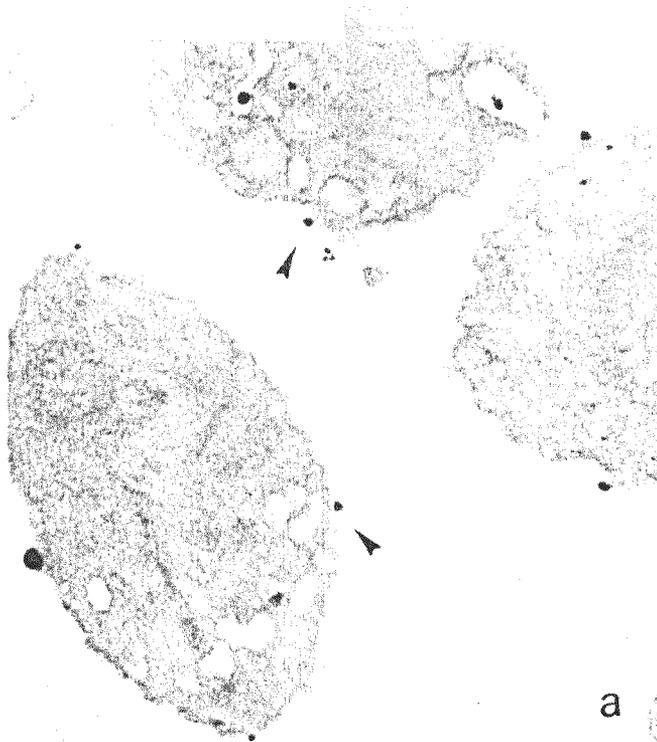


FIGURA 6: Determinación del ión Ca^{2+} mediante la técnica del PPA. Secciones sin contrateñir.

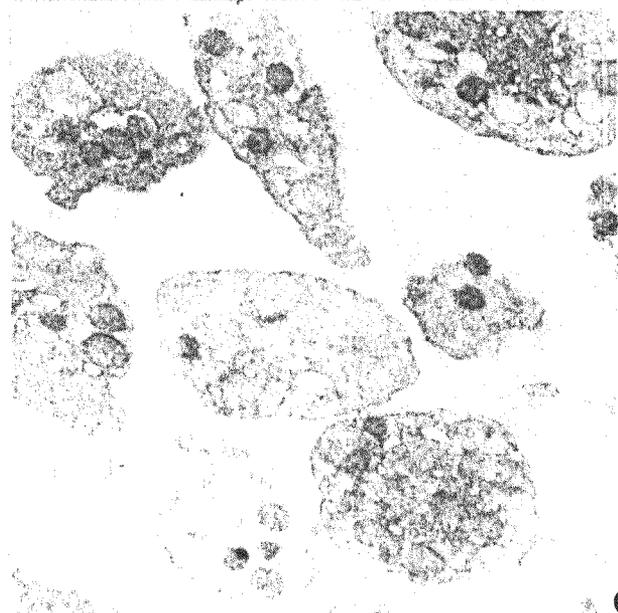
- a: Precipitados electrodensos de antimoniato Ca^{2+} a nivel de la membrana plasmática (▲). (x 70.290).
- b: Nótese la existencia de tinción específica en el SCCS (*). (x 71.280).
- c: Sección de plaquetas incubadas con Cl_2La previamente a la técnica del PPA. Nótese como el precipitado ha desaparecido totalmente de la membrana citoplasmática y posee menor intensidad en el SCCS (*). (x 42.400).
- d: La quelación de Ca^{2+} por EDTA con anterioridad a la realización de la técnica abolió totalmente la reacción (x 33.600).
- e: Obsérvese depósitos densos de antimoniato Ca^{2+} en la zona de microtúbulos de una plaqueta en el inicio de su activación. (x 59.130).
- f: En esta micrografía se observa otro estado más avanzado de activación con la zona de microtúbulos reactiva al PPA. (x 87.780).



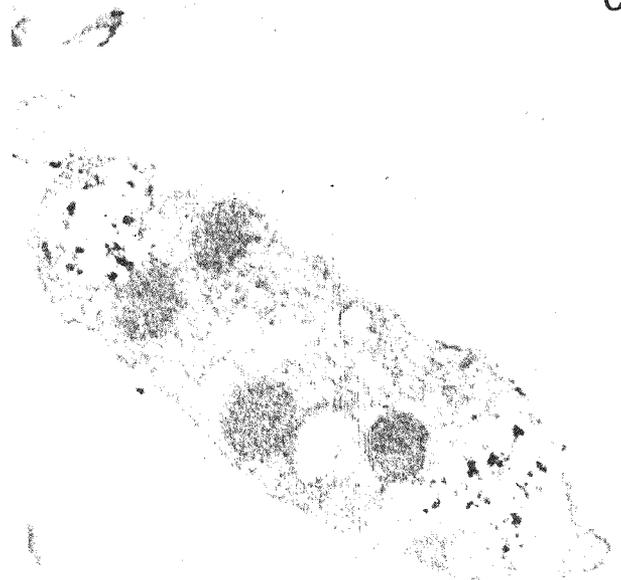
a



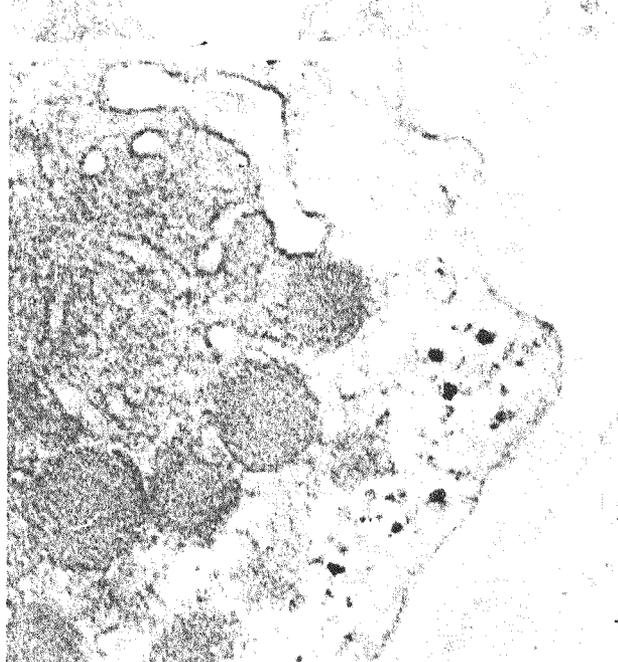
c



d



e



f

el SCCS (Fig. 6b). La presencia de precipitado en el DTS y orgánulos celulares es de escasa o nula relevancia.

No obstante, este puede aparecer en la zona de microtúbulos en plaquetas en distinto estado de activación (Fig. 6e, 6f). Tal hecho pudo ser observado gracias a la cantidad de secciones plaquetarias existentes en un solo corte fino no siendo, por tanto, de extrañar la presencia de algunas de ellas en estado activado. Igual que en el caso anterior, el tratamiento previo, a la técnica del PPA, con EDTA produjo la pérdida completa de la reacción (Fig. 6d).

Teniendo en cuenta que el lantano es un ión que compite con el calcio por sus lugares de unión, para determinar las características del calcio revelado por ambos procedimientos, las plaquetas fueron preincubadas con Cl_2La . En estas condiciones, la precipitación obtenida con la técnica del OPA no varió sensiblemente respecto a la tinción obtenida inicialmente. Sin embargo, en la técnica del PPA, la adición de lantano dió como resultado la desaparición del precipitado en la membrana plasmática y, en mucha menor proporción, en el SCCS (Fig. 6c).

Siguiendo el método de Mayahara y cols. (1980) para la valoración citoquímica de la actividad p-nitrofenilfosfatasa (característica de la fase de defosforilación en el

funcionamiento del complejo ATPasico que media los cambios Na^+-K^+) observamos la presencia de un precipitado de plomo definido en el DTS (Fig. 7a), SCCS y membrana externa (Figs. 7b, 7c, 7d). Asimismo, en algunas ocasiones se detectan, precipitados de tipo puntual en la membrana de los gránulos densos (Figs. 7a, 7b).

Tal como era de esperar, la presencia de DMSO en el medio de incubación aumentó el precipitado anteriormente citado siendo este cambio más relevante en la membrana plasmática y SCCS (Figs. 7e, 7f).

Para determinar la actividad no dependiente de K^+ , algunas plaquetas fueron incubadas en un medio en el que el K^+ había sido sustituido por Na^+ . En estas condiciones, los depósitos de plomo aparecen exclusivamente en el DTS (Figs. 7g, 7h), no pudiéndose observar ni en el SCCS ni en la membrana plasmática.

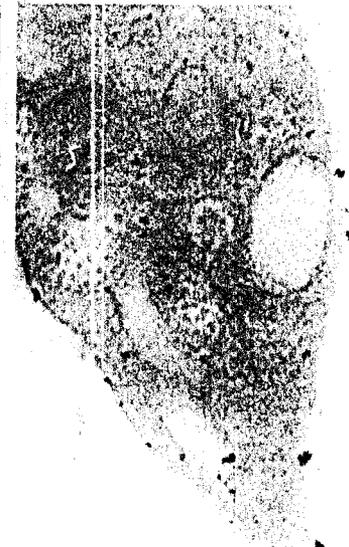
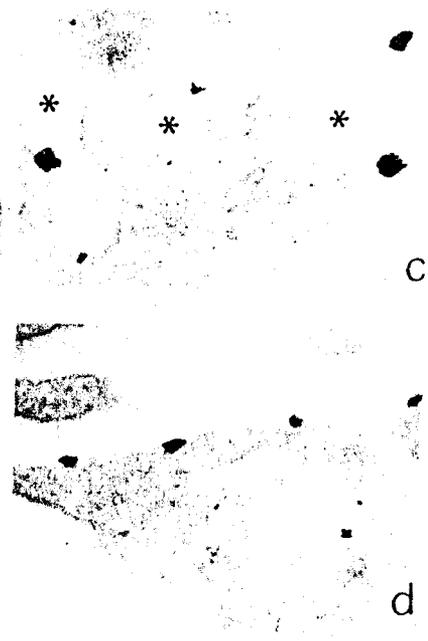
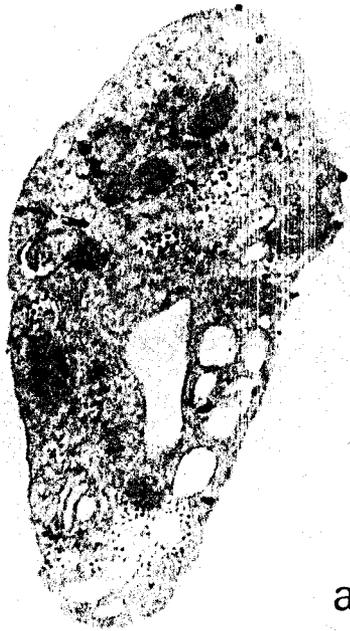
Cuando añadimos ouabaína al medio completo de reacción detectamos la pérdida del precipitado en las zonas de membrana en contacto con el medio externo (Figs. 7i, 7j) y la disminución de la reacción del DTS.

Tras la eliminación del p-nitrofenilfosfato del medio de incubación, no hemos observado ningún tipo de precipitado (Fig. 7k).

FIGURA 7: Determinación de la actividad p-Nitrofenilfosfatasa dependiente de K^+ según el método de Mayahara y cols. (1980).

- a: Precipitado específico de plomo en el DTS y membrana de los gránulos α . Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 59.670).
- b: Sección en la cual se aprecia, además de la reactividad del DTS y gránulos α a esta técnica, la existente a nivel del SCCS. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 52.400).
- c: Detalle de la reacción en el SCCS (*). Sección sin contrateñir. (x 101.700).
- d: Precipitado de plomo bien definido en la membrana citoplásmica de la plaqueta mostrada. Sección sin contrateñir. (x 88.250).
- e: La adición de DMSO al medio de incubación produjo un aumento de la intensidad de la tinción en los lugares reactivos. Nótese que este incremento es mayor a nivel de la membrana citoplasmática y SCCS. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 60.480).
- f: Otra sección plaquetaria donde podemos observar nuevamente este aumento. Sección sin contrateñir. (x 93.200).
- g: Observese la desaparición del precipitado a nivel de la membrana plasmática y del SCCS, tras la sustitución del ión K^+ del medio de incubación por el ión Na^+ . Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 65.340).

- h: Figura a gran aumento en la que se muestra el precipitado de plomo en el interior del DTS. Sección sin contrateñir. (x 210.000).
- i: La adición de ouabaina al medio completo de incubación provocó la desaparición del precipitado de plomo a nivel de la superficie exterior (membrana plasmática y SCCS). Sección sin contrateñir. (x 67.650).
- j: Detalle de la anterior figura a mayor aumento, en el que se aprecia el precipitado producido en el DTS. Nótese también la disminución de la reacción obtenida comparada con anteriores micrografías. Sección sin contrateñir. (x 103.125).
- k: Sección plaquetaria donde no se observa ningún tipo de precipitado de plomo tras la incubación del material en un medio carente de p-nitrofenilfosfato. Sección sin contrateñir. (x 44.820).



La demostración citoquímica de la actividad adenilato ciclasa, por los procedimientos a y b descritos en apartado de Material y Métodos, no dió resultados valorables ya que, con el primero, el precipitado era inespecífico y con el segundo no se manifestó la reacción. Por ello, modificamos la técnica b adaptandola en un solo paso. Ello nos permitió trabajar a un pH idóneo para esta actividad (pH 9.0) y evitar la aparición de precipitado en la solución, hecho que se produce al trabajar a un pH tan alto. En estas condiciones y con todos los estimuladores ensayados, pudimos observar depósitos de plomo específicos en el DTS de las plaquetas.

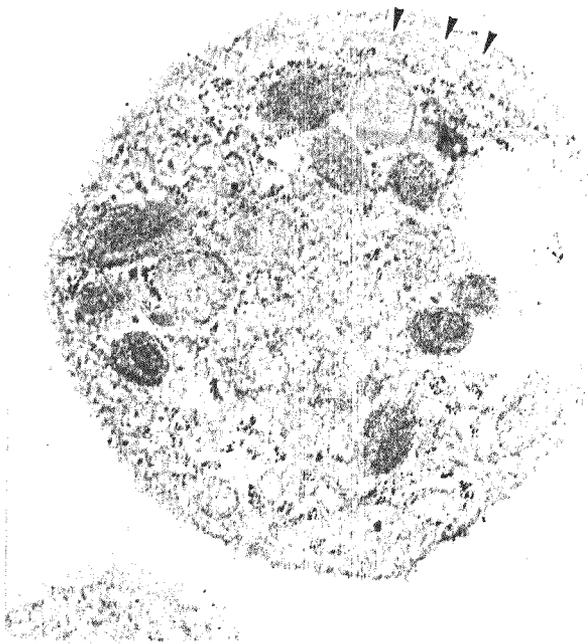
La estimulación con PGE_1 dio lugar a un fino precipitado a nivel de todos los túbulos que forman el DTS. En las Figs. 8a, 8b podemos observar dos secciones de distinta orientación en las que el precipitado aparece perfectamente repartido por todo este sistema. El precipitado, localizado en el interior de los túbulos, (Fig. 8c) se encuentra asociado a la cara interna de la membrana que los delimita (Fig. 8d).

La utilización simultánea de los estimuladores PGE_1 y PGD_2 no parece modificar la intensidad del precipitado anteriormente observado (Figs. 8e, 8f). Sin embargo, cuando el medio contenía sólo PGD_2 como activador, además de una

FIGURA 8: Imágenes correspondientes a plaquetas incubadas en el medio de detección de la actividad Adenilato Ciclasa, según la modificación realizada por nosotros del de Cutler y cols (1985).

- a: Sección longitudinal de una plaqueta en la cual se muestra la presencia de fuerte precipitación de plomo en el DTS. En este caso el tratamiento se realizó en presencia de PGE_1 como estimulador. Véase la asociación existente entre el sistema de túbulos reactivos y la banda de microtúbulos (\blacktriangle). Sección sin contrateñir. (x 52.800).
- b: Sección transversal en la que podemos apreciar nuevamente la reacción específica del DTS. Obsérvese la distribución de estos túbulos a lo largo de todo el citoplasma. PGE_1 como estimulador. Sección sin contrateñida. (x 84.000).
- c: En esta micrografía podemos apreciar la ausencia de precipitado a nivel de la membrana plasmática y del SCCS (*). Estimulación con PGE_1 . Sección sin contrateñir. (x 50.400).
- d: A mayor aumento se observa como el precipitado en el DTS se encuentra asociado a la cara interna de la membrana que delimita a cada tubo. Estimulación con PGE_1 . Sección sin contrateñir. (x 271.320).
- e: La estimulación con PGE_1 y PGD_2 no altera la precipitación, tal como se muestra en esta micrografía. Sección sin contrateñir. (x 33.800).

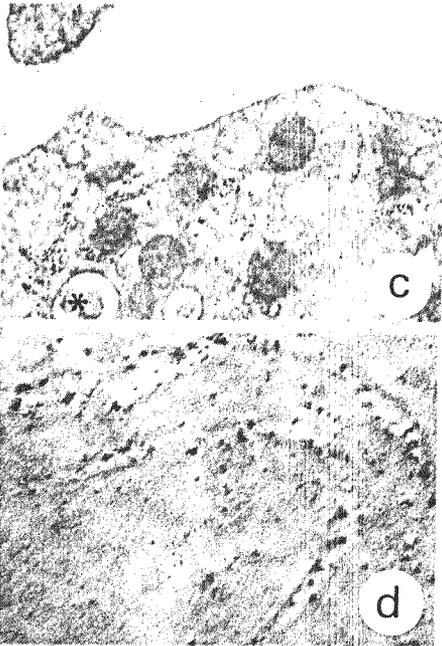
- f: Figura semejante a la anterior pero a mayor aumento. Sección sin contrateñir. (x 44.480).
- g: Drástica disminución del precipitado a nivel de los túbulos del DTS cuando en el medio solo se encuentra la PGD_2 como estimulador. Sección sin contrateñir. (x 61.290).
- h: Micrografía semejante a la anterior en la que se observa la reacción en presencia de PGD_2 como único estimulador. Sección sin contrateñir. (x 29.000).
- i: Paralelamente a la disminución de precipitado debido a la utilización única de PGD_2 , la reacción desapareció de algunos túbulos. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 29.000).



a



b



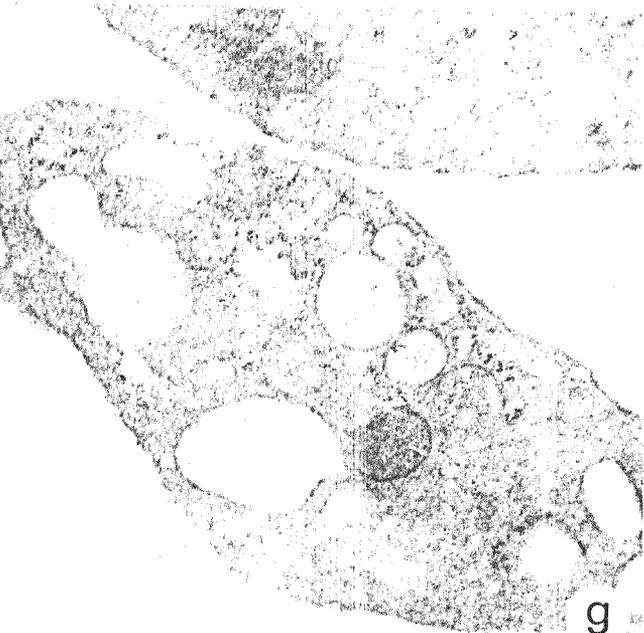
c



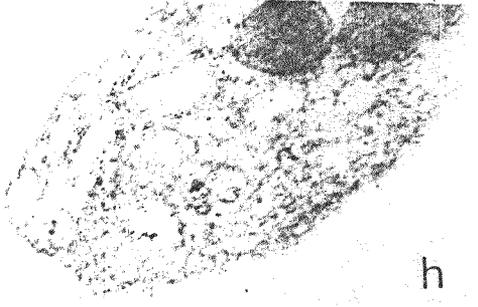
e



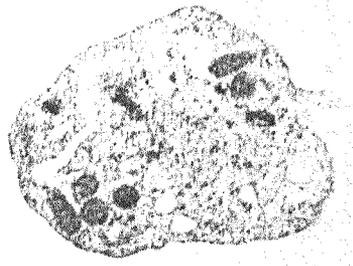
f



g



h



i

disminución de la intensidad de tinción (Figs. 8g, 8h), observamos que no todos los túbulos del sistema eran reactivos (Fig. 8i).

La estimulación producida por el diterpeno forskolina pareció modificar la actividad cAMPasa, al producir un aumento de la intensidad del precipitado localizado en el DTS (Figs. 9a, 9b).

La combinación de los estimuladores PGE_1 + PGD_2 + Forskolina originó una drástica disminución de la reacción (Figs. 9c, 9d), aunque menor a la observada al utilizar exclusivamente PGD_2 . Asimismo, en estas condiciones, apreciamos que no todos los túbulos contenían precipitado y que este no era totalmente homogéneo.

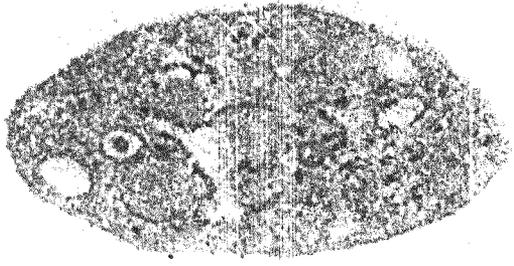
La preincubación y posterior incubación de las plaquetas con trombina, adicionada esta a todos los medios de reacción utilizados, produjo la total desaparición del precipitado producto de la actividad cAMPasa (Figs. 9e, 9f). Sin embargo, el tratamiento con alloxan, ensayado también en todos los medios, aunque conduce a la casi total desaparición del precipitado, no lo evita completamente cuando esta en presencia de PGE_1 (Fig. 9g) o forskolina (Fig. 9h).

La ausencia de sustrato en los distintos medios impidió la aparición de precipitado (Fig. 9i).

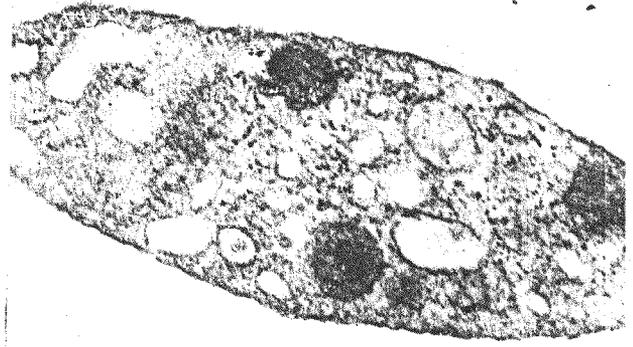
FIGURA 9: Nuevos detalles de la determinación citoquímica de la actividad cAMPasa.

- a: Fuerte reactividad del DTS debido a la estimulación por forskolina. Sección sin contrateñir. (x 48.000).
- b: El precipitado de plomo obtenido se localiza a nivel de todos los túbulos del DTS. Forskolina como estimulador. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 45.600).
- c: En comparación con las pruebas anteriores la combinación de los tres estimuladores utilizados produce una pérdida notable del producto de reacción. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 50.400).
- d: En esta sección se observa la pérdida casi total de reactividad, demostrándose la presencia solo de algunos túbulos con precipitado. Estimuladores $PGE_1 + PGD_2 + Fors-$ kolina. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 59.400).
- e: Secciones de plaquetas preincubadas e incubadas con el agente activador trombina. Nótese la ausencia total del precipitado. Estimulador PGE_1 . Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 41.580).
- f: Sección perteneciente a plaquetas preincubadas con trombina e incubadas con medio completo conteniendo PGE_1 y forskolina. La reactividad citoquímica para la cAMPasa sigue siendo nula. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 29.000).

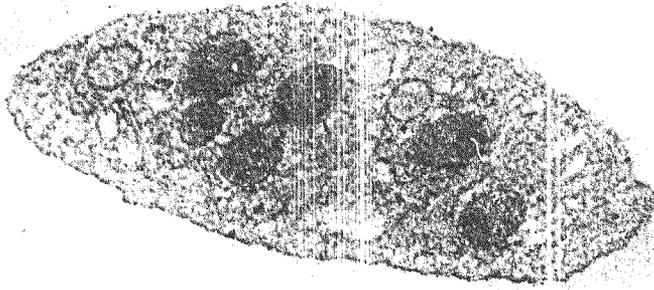
- g: En esta imagen, nótese la presencia de una pequeña reactividad enzimática (▲) en el DTS, tras la incubación de las plaquetas en el medio completo con alloxan como inhibidor y PGE₁ como estimulador. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 60.900).
- h: Nueva pérdida de precipitado tras la introducción de alloxan. El escaso precipitado observado sigue localizándose a nivel del DTS (▲). Forskolina como estimulador. Sección contrateñida con acetato de uranilo. (x 54.780).
- i: Micrografía en la que se observa la ausencia total de tinción tras la incubación en medio completo con PGE₁, pero en ausencia de sustrato. Sección sin contrateñir. (x 74.250).



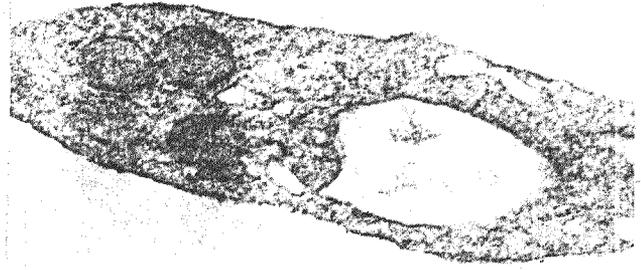
a



b



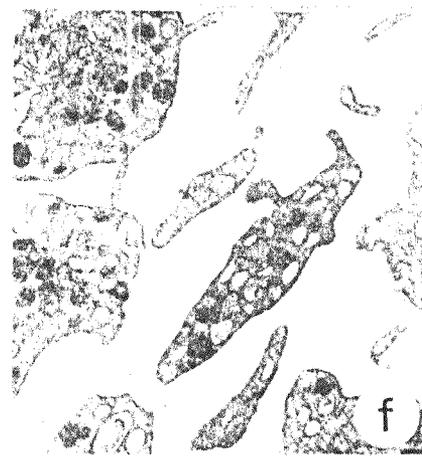
c



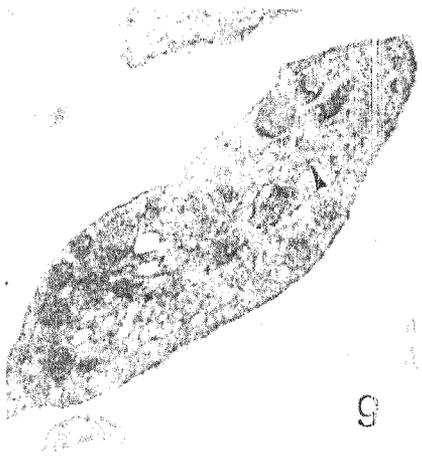
d



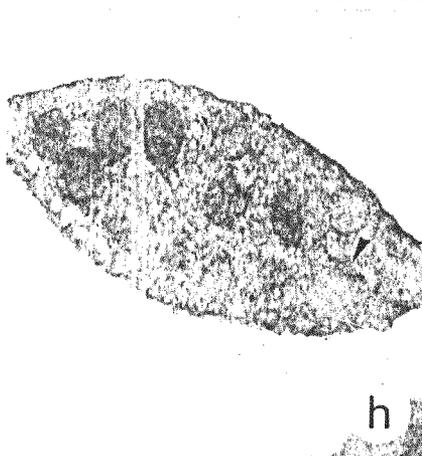
e



f



g



h



i

DISCUSION

La fiabilidad de un estudio sobre estructuras biológicas depende en gran medida de la buena preservación de sus características morfológicas y estructurales durante su extracción y manipulación. En el caso de las plaquetas, el empleo de diversos métodos de aislamiento constituyen la primera barrera que se ha de superar antes de ser sometidas a estudio. Por ello, el presente trabajo lo hemos iniciado comparando los dos métodos de aislamiento más ampliamente utilizados: el aislamiento de plaquetas en un plasma rico en plaquetas (PRP-citratado) a partir de sangre completa y el aislamiento a través de diversos lavados a partir del PRP-citratado. Este último sistema, original de Patscheke y Wörner (1978) y Patscheke (1981), cumple diversas funciones en la preservación de la estructura plaquetaria. Así, el tampón empleado para el lavado posee un pH de 6.5 que facilita el mantenimiento de la plaqueta en su estado inactivado (White, 1983) optimizando la función de la apirasa que lleva incorporada. Esta enzima junto con la PGE₁

actúa como agente bloqueador de la activación plaquetaria (Patscheke y Wörner, 1978).

En un principio, tras la realización de la prueba de agregación llevada a cabo con potentes agentes agregantes (ADP, trombina, epinefrina y ácido araquidónico), no parecía existir diferencias significativas entre los dos métodos de aislamiento ensayados. Sin embargo, estas diferencias se pusieron de manifiesto al realizar el análisis morfométrico. Para plaquetas que sufrieron el proceso de lavado, la razón axial (r_p) es de 0.37, con lo cual podrían ser calificadas como discocitos (Discocitos: plaquetas con forma elipsoidal con $r_p < 0.5$. Frojmovic y Milton, 1982; 1983). Por su parte, las plaquetas no lavadas presentaron un $r_p = 0.52$, correspondiente a células más esféricas, por lo que se asimilarían a discoequinocitos (Discoequinocitos: presentan $0.5 \leq r_p \leq 0.9$. Frojmovic y Milton, 1982; 1983). El mismo resultado se puede observar también al comparar la relación existente entre el volumen y superficie de las plaquetas obtenidas por ambos métodos. Así, para plaquetas no lavadas, esta relación es 0.38 y para las lavadas es de 0.32 (para una esfera esta relación tendería a 1.0). Por todo ello, morfométricamente podemos considerar que las plaquetas aisladas según el método de lavado están mejor preservadas que las no lavadas, tal como previamente habíamos sugerido (González-Utor y López-Campos, 1987).

Estudios realizados a M.O. proponen, en el caso de los discocitos, una media de 1.0 y 3.1 μm para la longitud del eje corto y largo respectivamente, con un $r_p \approx 0.3$ (Frojmovic y Milton, 1982; 1983). Es de destacar, que aunque las plaquetas lavadas se incluyen dentro de la categoría de discocitos, la longitud de su eje mayor es corta con respecto a la longitud propuesta debido, probablemente, al método de fijación utilizado en esta experiencia. Sthal y cols. (1978), bajo M.E. y con métodos de aislamientos diferentes a los ensayados por nosotros, definen la longitud del eje mayor de 2.94 μm . Esta medida se corresponde con los valores dados para discocitos, aunque la longitud del eje corto determinada por estos autores es superior a la observada por nosotros en plaquetas lavadas (1.41 μm con respecto a 0.944 μm). Esto hace asemejar tales plaquetas con discoequinocitos o plaquetas en estado de activación.

En cuanto a los valores estereológicos obtenidos en ambos aislamientos, los parámetros de densidad de volumen (Vv), densidad de superficie (Sv) y densidad numérica (Nv) de los orgánulos celulares sólo muestran una pequeña diferencia en Nv de las mitocondrias ($p < 0.05$), observándose como hay más mitocondrias en las plaquetas lavadas que en las no lavadas. Sin embargo pueden apreciarse diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre los dos métodos al comparar la Sv y Vv del SCCS. En las plaquetas lavadas, Sv y Vv es el doble que en las plaquetas sin lavar. Este aumento

del SCCS producido por el proceso de lavado probablemente sea debido a la albúmina contenida en el tampón de lavado, necesaria como requerimiento para mantener la estabilidad del discocito (Frojmovic y Milton, 1982). De hecho, se conoce la capacidad de esta proteína plasmática para producir cambios en el área y volumen de los hematies con objeto de mantener la forma de los mismos (Jay, 1975).

El sistema tubular denso (DTS) no parece afectarse por los métodos de aislamientos ensayados, puesto que no hemos encontrado diferencias significativas entre los parámetros valorados. Sin embargo, la gran superficie observada, consecuencia de la naturaleza tubular de este sistema, es mayor a la obtenida por otros autores (Sthal y cols., 1978).

Por todo lo hasta ahora comentado y basándonos fundamentalmente en los resultados obtenidos tras el análisis morfométrico, consideramos que de los dos métodos de aislamientos ensayados el que incluye varios lavados del PRP-citratado es el más idóneo, ya que preserva mejor la estructura plaquetaria.

Una vez seleccionado el método de aislamiento más adecuado para el estudio de las plaquetas a M.E., centramos nuestra atención en las posibles influencias ejercidas por los fijadores sobre el material.

Los fijadores utilizados en los estudios de plaquetas a M.E. son muy numerosos, habiendose sugerido que bajas concentraciones de glutaraldehído producen mínimas alteraciones morfológicas (White, 1983). Tras haber llevado a cabo un estudio bibliográfico de los diferentes fijadores empleados por distintos autores, hemos comparado tres de ellos: Fijador A, según White (1983),; Fijador B, según Pastcheke (1981) y Fijador C. Este último, es una modificación que hemos realizado, que consiste en utilizar una baja concentración de glutaraldehído en el mismo tampón de lavado.

Morfométricamente podemos observar como de los tres fijadores el C es el que mantiene las plaquetas en forma más discoidal, llegando a tener las longitudes de los ejes mayor y menor los valores obtenidos con otros métodos de análisis (Frojmovic y Milton, 1982). Las razones entre la longitud del eje mayor y menor es menor para el fijador C que para el fijador A y este menor que para el fijador B.

Si comparamos todas las longitudes mayores y menores obtenidas con los tres métodos de fijación, e incluso las consideradas en la parte experimental anterior, podemos ver que las mayores diferencias se producen en la longitud del eje mayor de las plaquetas. Como en este plano se halla el anillo de microtúbulos, creemos que una menor longitud de este eje puede significar una contracción de los mismos y

por lo tanto un estado inicial de activación (White, 1984). Las plaquetas tratadas con el fijador C, son las que poseen una mayor longitud en este eje, siendo similar a los resultados obtenidos por otros autores (Frojmovic y Milton, 1982; 1983).

Asimismo, las estimaciones geométricas de volumen y superficie son mayores para el fijador C que para los otros dos fijadores. Esto demuestra que las plaquetas fijadas según este método son las que mejor mantienen la forma de discocito, presentando un mayor volumen y superficie y alcanzando valores muy semejantes a los previamente publicados (Frojmovic y Milton, 1982).

Por otra parte, en cuanto a los valores esterológicos que hemos obtenido con los tres fijadores empleados, se puede apreciar como con el fijador A todos los parámetros de los gránulos densos son superiores a los obtenidos con los otros dos fijadores. Para White (1983), una mayor presencia de estos gránulos en las secciones de corte es indicativa de una mejor preservación de la estructura plaquetaria. Asimismo, existen diferencias en los gránulos α y SCCS, siendo siempre las medidas mayores en el fijador A que en los otros dos.

Aunque todas estas diferencias son valorables, no podemos olvidar que las medidas de densidad de volumen,

superficie y numérica, están expresadas por unidad de volumen plaquetario (μm^3 de plaqueta). Puesto que existe una marcada diferencia entre el volumen de las plaquetas fijadas con el fijador A y las fijadas con el B y C, se hace necesaria una valoración en función del volumen total obtenido en cada uno de los fijadores. En tal sentido observamos que, si bien la relación volumen total de los orgánulos / volumen de la plaqueta es mayor con el fijador A que con el B y C, el volumen citoplásmico relativo es mayor en B y C que en A.

La presencia de pseudópodos en plaquetas en forma de discocito es fácilmente observable, siendo la aparición de los mismos uno de los primeros pasos en la activación (Frojmovic y Milton, 1982). La presencia de estos nos hace pensar en la existencia de un flujo de citoplasma del disco plaquetario al pseudópodo en formación y por tanto una pérdida del porcentaje de citoplasma en el discocito. Esto junto con el hecho de que el número total de orgánulos por plaqueta permanece prácticamente constante y que las diferencias halladas en porcentajes de volumen y superficie de los orgánulos, son inexistentes cuando comparamos sus valores absolutos nos hace suponer que las plaquetas tratadas con el fijador A presentarían más pseudópodos que las tratadas con los fijadores B y C.

El número de orgánulos totales por plaqueta que hemos obtenido para cada uno de los fijadores es prácticamente el mismo y superior al descrito por algunos autores (Duyvené y cols., 1987; Sthal y cols., 1978.; Werner y Morgenstern, 1980). Esta diferencia probablemente sea debida a las distintas técnicas de muestreo utilizadas por algunos de ellos y por tanto no creemos que deba ser considerada como significativa.

Aunque, como comentamos anteriormente, el número total de orgánulos por plaqueta es prácticamente el mismo con los tres fijadores, existen ligeras diferencias entre ellos si los comparamos según el tipo de orgánulo. Así, las plaquetas fijadas con A presentan más gránulos densos que las fijadas con B y C pero estas contienen más mitocondrias y gránulos α . Si bien para el autor del método original A (White, 1983) el número de gránulos densos por plaqueta esta en relación con la conservación de la estructura, no son ellos los únicos que han de considerarse en las valoraciones morfológicas. Así, es bien sabido que las mitocondrias son unos de los orgánulos celulares más sensibles a daño (Tzagoloff, 1982), dada su labilidad ante los métodos de fijación, y es precisamente este orgánulo el que disminuye notablemente, tanto en número como en volumen, con el fijador A.

Los gránulos densos están en mayor número y presentan mayor volumen en las plaquetas fijadas con C que con B. Por su parte, los gránulos α se encuentran en proporción inversa a los gránulos densos. Esto podría ser debido a una alteración producida por el fijador B, la cual, de acuerdo con White y Gerrard (1978), provocaría la pérdida del nucleóide de los gránulos densos pudiéndose entonces confundirse con los gránulos α .

Todos los parámetros de los orgánulos hallados con los tres fijadores son mayores a los obtenidos en la primera experiencia analizada para comprobar el método de aislamiento más idóneo. Consecuentemente, podemos observar como una fijación inadecuada puede llegar a alterar tanto la morfología como la ultraestructura de las plaquetas.

En lo que respecta al SCCS no varió prácticamente entre los tres métodos de fijación. Sthal y cols (1978), utilizando un método distinto de aislamiento y fijación, definieron en plaquetas con rp mayor al obtenido por nosotros un volumen y superficie totales similares a los que hemos descrito.

El SCCS puede ser externalizado tras un proceso activador sin causar lisis celular (Milton y Frojmovic, 1979). Al tratar discocitos con un medio hipotónico, este sistema queda externalizado en su totalidad (Milton y

Frojmovic, 1979) dando una superficie total de 30-40 μm^2 . Las plaquetas fijadas con el fijador C son las que al sumar la superficie de su membrana externa y la del SCCS se ajustan más al valor anterior. Por otra parte, si sumamos todas las superficies que pueden externalizarse en un proceso final de activación (SCCS, gránulos α , gránulos densos y DTS) obtendríamos un valor de $\approx 70 \mu\text{m}^2$, medida semejante a la obtenida por Bessis y Ereton-Gorius (1965) en plaquetas estiradas en superficie.

Como comentamos al tratar el efecto del método de aislamiento, las plaquetas lavadas duplican la Vv y Sv del SCCS. También existe una duplicación de estos parámetros con los protocolos de fijación A, B y C. Esto nos hace pensar que el aumento producido en este sistema no es dependiente del método de lavado, como anteriormente consideramos, sino reflejo de una mejor preservación ultraestructural obtenida al conjugar las técnicas de lavado y fijación.

El DTS es un sistema de endomembranas que juega un papel importantísimo en los procesos de activación plaquetaria (White, 1984). Es considerado como un sistema tubular constituido por una red ramificada de canalículos que se extiende por toda la plaqueta (Werner y Morgenstern, 1980). Estereológicamente se caracteriza por presentar una alta Sv y una baja Vv, determinantes de su forma tubular. Comparativamente, podemos observar como la relación V/S to-

tal de este sistema se hace menor con los métodos de fijación B y C con respecto a A. Estas relaciones son menores a las obtenidas en el primer apartado, lo cual nos induce a sugerir que este sistema preserva mejor su característica morfológica tubular al utilizar métodos de aislamiento y fijación correctos.

Teniendo en cuenta todo lo hasta ahora comentado y de una manera general, podemos considerar que la organización subcelular de las plaquetas, tras las diferentes variantes de aislamiento y fijación, está bien conservada manteniéndose las típicas características ultraestructurales (White y Gerrard, 1978; White, 1983, 1984). Sin embargo, las plaquetas aisladas por el proceso de lavado y fijadas a baja concentración de glutaraldehído (fijador C) son las que muestran el mejor grado de preservación tanto desde el punto de vista ultraestructural como morfométrico y estereológico, si bien estas diferencias fueron mínimas al comparar los tres métodos de fijación.

Dado que el mantenimiento de la estructura y función de una célula queda reflejado en la conservación de su arquitectura molecular, hemos caracterizado determinados componentes y actividades enzimáticas de las plaquetas a fin de detectar la fiabilidad del método de aislamiento y fijación elegidos.

Tras la aplicación de la técnica ácido peryódico-tiocarbohidracida-proteinato de plata se pusieron de manifiesto pequeñas agrupaciones y partículas dispersas de glucógeno en el citoplasma plaquetario. Estos precipitados no se observaron en todas las secciones pudiendo ser debido a las distintas edades de las plaquetas que normalmente se encuentran en un corte. En tal sentido, las más jóvenes son las que tienen la tasa más elevada de glucógeno y mayor capacidad de síntesis del polisacárido (Karparkin, 1969). Asimismo, es de destacar la presencia de voluminosas partículas de glucógeno que rodean al SCCS. Siendo este sistema una vía de conducción de distintos estímulos hacia las zonas más profundas de las células (White y Clawson, 1980) podría también intervenir en la transmisión del estímulo produciendo una rápida movilización de la energía almacenada en forma de glucógeno.

La ausencia de precipitado de plata en la superficie plaquetaria, tanto en la membrana externa como en el SCCS y la presencia de un fino precipitado en ambas zonas tras la realización de la técnica del hierro coloidal nos puso de manifiesto una de las principales características de la cubierta externa: su carga neta negativa (White, 1971a).

La regulación del estado inactivado en plaquetas deriva de una serie de acontecimientos, cuyo fin es el manteni-

miento de la concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático por debajo del nivel requerido para la activación celular (Statland y cols., 1969). Por ello, creímos necesario determinar citoquímicamente la distribución subcelular del Ca^{2+} en las plaquetas obtenidas por nosotros.

La necesidad de utilizar oxalato y fosfato para atrapar o estabilizar intracelularmente el Ca^{2+} , durante la primera fijación en glutaraldehído, y su posterior conversión en una sal electrodensa de piroantimoniato (Borgers y cols., 1984), nos hizo modificar ligeramente el proceso de fijación elegido inicialmente para la realización de las técnicas citoquímicas. De esta manera, intentamos conseguir una alta reproductibilidad del método original de Borgers y cols. (1984) y tratamos de observar alguna posible pérdida o redistribución del Ca^{2+} producida por el aislamiento más que por la fijación. De echo se conoce el efecto negativo de algunos fijadores en la localización de este ión (Simson y cols., 1980).

La presencia de precipitados electrodensos, tras la realización de la técnica oxalato-pirantimoniato (OPA), nos mostró los característicos lugares almacenadores de calcio en la plaqueta como son el DTS, gránulos densos y mitocondrias (Gerrard y White, 1978; Thompson y Scrutton, 1985). Asimismo hemos observado, aunque sólo en determinadas ocasiones, algunos gránulos α conteniendo precipitados

electrodensos en el nucleóide que probablemente representen una pequeña parte del calcio total de las plaquetas (Sato y cols., 1975). Con esta técnica aparece en el citoplasma un discreto precipitado no asociado a ningún orgánulo o estructura específica que, como considera Nothover (1985), podría ser debido a la liberación, durante la fijación, del calcio asociado a membrana y posterior unión al oxalato antes de su conversión en una sal de antimoniato.

Por otra parte, la obtención de un precipitado en la superficie externa del SCCS, ya definido por otros autores (Daimon y cols., 1978) utilizando oxalato como agente atrapador, hace suponer en un posible reservorio o almacén de este ión asociado a proteínas o glicoproteínas de membrana (Kretsinger, 1979). Sin embargo, el principal sitio de unión del Ca^{2+} a las glicoproteínas de membrana es el complejo IIb - IIIa que se encuentra en estado disociado en plaquetas no activadas y por tanto no está unido a Ca^{2+} (Polley y cols., 1981). Esto mismo ocurre con otras proteínas y glicoproteínas de membrana que intervienen en la activación plaquetaria y cuya función es dependiente de Ca^{2+} (Rotman, 1985). Todo ello nos hizo pensar que este "pool" de almacenamiento no existe en plaquetas en estado inactivado. En tal sentido, el precipitado que visualizamos en el exterior del SCCS podría ser reflejo de una activación inicial producida por el método citoquímico empleado o de una precipitación inespecífica de Ca^{2+} en ese lugar. Por

ello, con objeto de determinar si el Ca^{2+} detectado era intercambiable, y por lo tanto asociado a membrana e indicativo de una activación, realizamos la técnica del OPA con una incubación previa en Cl_3La , ya que el lantano es un conocido ión que compite con el calcio por sus lugares de unión a membrana. En estas condiciones, el precipitado no se vió afectado por el Cl_3La lo cual nos lleva a sugerir que el Ca^{2+} localizado en la zona exterior del SCCS podría corresponderse con Ca^{2+} liberado de la membrana (Nothover, 1985), atrapado por el oxalato en forma de oxalato calcico y precipitado por el antimoniato antes de su salida de los tortuosos canales del SCCS.

La utilización del fosfato como agente estabilizador del Ca^{2+} intracelular antes de su conversión en una sal de antimoniato permitió asimismo la localización de un precipitado asociado a la cara interna de la membrana que probablemente sea debido a la formación de complejos estables constituidos por Ca^{2+} -fosfolípidos ácidos-fosfato a pH neutro (Boskey y Posner, 1982). Fosfolípidos candidatos a esta unión con el Ca^{2+} serían la fosfatidil serina y los polifosfoinositoles (Borges y cols, 1984).

Tal asociación a membrana del Ca^{2+} evidencia la existencia de un reservorio de Ca^{2+} en la cara interna de la membrana dado que es esta zona donde los fosfolípidos antes mencionados se encuentran en mayor proporción (Perret y

cols., 1979; Bearer y Friend, 1986). Este Ca^{2+} es intercambiable puesto que al preincubar con Cl_2La el precipitado desaparece en la membrana plasmática quedando minimamente presente en la membrana del SCCS.

El EDTA, conocido agente quelante de Ca^{2+} , es un control esencial en las pruebas de detección de Ca^{2+} , suficiente para evidenciar que un precipitado contiene Ca^{2+} , aunque éste no sea su único componente, sin necesidad de recurrir a micropruebas con rayos X (Wick y Hepler, 1982). En nuestro material la incubación con EDTA previa a la realización de ambas técnicas (OPA y PPA) abolió el precipitado anteriormente comentado, confirmando la presencia de Ca^{2+} en el mismo.

La ATPasa activada por sodio y potasio posee la maquinaria catalítica necesaria para el acoplamiento de la energía liberada por la hidrólisis del ATP al intercambio de Na^+ y K^+ a través de la membrana de las células, contra sus respectivos gradientes de concentración (Ernst y Hootman, 1981). En plaquetas no activadas esta enzima mantiene relativamente baja la concentración intracelular de sodio y alta la de potasio y, consecuentemente, un potencial de transmembrana negativo en el interior (Rotman, 1985).

Para poner de manifiesto la actividad ATPasa- Na^+/K^+ en plaquetas, determinamos citoquímicamente la actividad p-nitrofenilfosfatasa que representa el paso final de defosforilación de la ATPasa- Na^+/K^+ (Glynn, 1985). Así, utilizando el método de paso único original de Mayahara, (Mayahara y cols., 1980; Mayahara y Ogawa, 1980) observamos un precipitado definido en la superficie interna de la membrana plasmática y SCCS. Como el SCCS está formado por invaginaciones de la cubierta externa, es lógico pensar que ambas estructuras membranosas presenten las mismas actividades enzimáticas.

Dada la capacidad que tiene el DMSO para estimular la actividad K^+ -NPPasa (Alberts y Koval, 1972), la adición de dicho compuesto al medio de incubación aumentó el precipitado observado. Cuando la incubación se realizó en un medio en el que el K^+ había sido sustituido por Na^+ o bien en un medio conteniendo ouabaína, no apareció precipitado alguno en estas membranas confirmando que la actividad localizada en la membrana externa y SCCS se corresponde específicamente con la K^+ -NPPasa.

A diferencia de los resultados obtenidos por Cutler y cols., (1980; 1981), nuestros datos parecen sugerir que entre la membrana plasmática y el SCCS no existe segregación en cuanto a actividad K^+ -NPPasa se refiere. Estos autores, utilizando una modificación de la técnica de doble paso

descrita por Ernst (1972a;b), localizaron depósitos densos en la membrana externa pero no en el SCCS, en el cual detectaron actividad ATPásica dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Ello les llevó a postular la existencia de dos regiones diferenciadas en cuanto a su dotación enzimática: la membrana externa y la membrana del SCCS (Cutler y cols., 1978; 1981). Estudios bioquímicos más recientes han puesto de manifiesto que la actividad ATPasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ se localiza exclusivamente en el DTS (Steiner y Lüscher, 1985). Así la ausencia de actividad K^+ -NPPasa en el SCCS probablemente sea debido a la desventaja que ofrece el método de doble paso en cuanto a la utilización de un pH no óptimo para esta actividad y a la inevitable difusión del producto de reacción tras el paso de conversión del fosfato de estroncio a fosfato de plomo para su visualización a M.E.

La actividad no dependiente de K^+ e insensible a ouabaína localizada en el DTS podría ser reflejo de una ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} anteriormente comentada.

Todos los datos anteriormente expuestos podrían confirmar la naturaleza del precipitado obtenido por nosotros. Así el hallado en la membrana externa y SCCS sería reflejo de la actividad K^+ -NPPasa mientras que el localizado en el DTS, probablemente dependiente de Mg^{2+} y no inhibido por ouabaína, correspondería a una ATPasa translocadora de Ca^{2+} .

Por otra parte, la reacción encontrada en la membrana de los gránulos α , no dependiente de K^+ e insensible a ouabaina, sería una ATPasa estimulada por Mg^{2+} (Grinstein y Furuya, 1982;). Tal enzima podría estar asociada a una traslocación de protones encaminada al mantenimiento de la naturaleza ácida del interior de los gránulos α con respecto al citosol (Grinstein y Furuya, 1983).

En las plaquetas, una de las actividades enzimáticas de mayor relevancia es la adenilato ciclasa (cAMPasa) ya que su producto, el adenosin-monofosfato cíclico (cAMP), parece actuar como primer mensajero intracelular para el mantenimiento del estado inactivado de las plaquetas (Aktories y Jakobs, 1985). Esto se realizaría a través de la movilización de Ca^{2+} libre citoplásmico hacia el interior del DTS (Blache y cols., 1987) y la inhibición de otro sistema generador de señales denominado vía metabolizante de fosfoinositoles (Watson y cols., 1984; Jakobs y cols., 1986).

Para la localización citoquímica de la actividad adenilato ciclasa, hemos utilizado como sustrato el análogo imido sustituido del ATP, el adenililimidodifosfato (App(NH)p) que es difícilmente hidrolizado por otras ATPasas o fosfatasas (Poeggel y cols., 1984). Para reducir la

posibilidad de precipitación inespecífica no enzimática (Kvinnsland, 1979; Cutler y Christian, 1980; Cutler, 1983), antes de su uso, purificamos el App(NH)_p a través de una columna catiónica Dowex AG-50W-X4. De esta manera, pudimos comprobar mediante los controles realizados (medición en espectrofotómetro de las alícuotas elucionadas y cromatografía del producto antes y después de su purificación) la presencia de impurezas como indica la casa comercial que nos suministró el producto.

Como medio citoquímico optamos, en un principio, por utilizar la variante realizada por Cutler y cols. (1981) del método de detección de la actividad p-Nitrofenilfosfatasa dependiente de K⁺ de Ernst (1972a,b). En este caso, observamos como el precipitado fue bastante inespecífico probablemente debido al doble paso que conlleva este método: captura del grupo imidodifosfato por estroncio y conversión del complejo en imidodifosfato de plomo. Este último paso suele ir acompañado de una difusión del producto que puede depositarse inespecíficamente (Ueno y cols., 1983).

Posteriormente, y con motivo de la modificación que los mismos autores hicieron a su método (Cutler y cols, 1985) intentamos localizar nuevamente la actividad adenilato ciclasa. A pesar de que el pH del medio utilizado no es el óptimo para la detección de la enzima (Poeggel y cols., 1984), Cutler y cols describieron la presencia de

precipitados específicos a nivel del DTS de las plaquetas. Sin embargo, nosotros no hemos conseguido que, en las mismas condiciones, se manifieste la actividad adenilato ciclasa. Tal hecho nos llevó a realizar una modificación del método anterior consistente en la utilización de tampón glicina-NaOH. Ello nos permitió realizar la incubación con plomo a pH alcalino y por tanto ajustar el medio a los requerimientos óptimos de la actividad cAMPasa. En estas condiciones, pudimos observar una precipitación específica definida en el DTS, signo de que es en este sistema de endomembranas, semejante a retículo endoplásmico liso, el portador de la enzima (Cutler y cols., 1985).

Asimismo, pudimos ver como la intensidad del precipitado variaba según el tipo de prostaglandina ensayada (PGE_1 y PGD_2). Esto probablemente sea debido al distinto grado de activación ejercida por cada una de ellas. De hecho se conoce que estas dos prostaglandinas poseen distintos receptores (Aktories y Jakobs, 1985), siendo quizás el más representativo el correspondiente a la PGE_1 . Así cuando la estimulación se realiza de manera simultánea con las dos, la intensidad del precipitado observado en el DTS no se modifica aparentemente con respecto a la estimulación única por PGE_1 .

La estimulación con forskolina produjo un aumento de la intensidad del precipitado en el DTS, quizás de manera más

llamativa que el observado con la PGE_1 . Esto podría ser debido a que el diterpeno actúa estimulando directamente la unidad catalítica de la cAMPasa, a diferencia de la PGE_1 que lo hace vía receptor a través del sistema acoplador N_s a la unidad catalítica (Hanoune y cols., 1985). Sin embargo, cuando estimulamos conjuntamente con las dos prostaglandinas y forskolina el precipitado se redujo considerablemente. Se sabe que bajas concentraciones de forskolina inhiben la actividad cAMPasa de las plaquetas aunque estén activadas por PGE_1 (Watanabe y Jakobs, 1986). Esto mismo puede haber ocurrido en este ensayo ya que la concentración del diterpeno fue 10 veces inferior a la empleada cuando este se utilizó de manera aislada.

En todos los casos, el precipitado se localizó exclusivamente en el DTS. Concretamente aparece asociado a la cara interna de la membrana de este sistema, lo cual nos lleva a pensar que el producto de la hidrólisis, el cAMP, se libera al interior del DTS. Esto quizás sea debido a que este sistema es el compartimento celular que mayor importancia tiene en el control de los estados inactivado-activado de las plaquetas (White, 1984).

La inhibición de la actividad llevada a cabo por la trombina fue total ya que no se observó precipitado en ninguna de las condiciones anteriormente comentadas. Sin embargo, el alloxan produjo una escasa inhibición de la

actividad probablemente debida a que este producto, utilizado por otros autores (Kvinnsland, 1979), es menos específico que la trombina la cual actúa a nivel de receptores específicos, produciendo una activación de la unidad inhibitoria N_1 de manera persistente. Consecuentemente inhibe de forma continuada y específica la actividad cAMPasa (Aktories y Jakobs, 1984).

La especificidad del precipitado en el DTS junto a la inhibición llevada a cabo por la trombina y la ausencia de precipitado en medio carente de sustrato confirman que esta modificación realizada por nosotros es adecuada para la localización de la actividad cAMPasa. De esta manera apoyamos la idea de la detección de actividades enzimáticas a pH alcalino por medio de un único paso, como la actividad p-nitrofenilfosfatasa dependiente de K^+ (Mayahara y cols., 1980) y la ATPasa de Ca^{2+} (Ando y cols., 1981), utilizando el tampón glicina-NaOH y citrato de plomo en las mismas condiciones.

CONCLUSIONES

Trás el estudio de los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1.- Las plaquetas aisladas según el método de lavado son las que presentan mejor preservadas sus características morfológicas y ultraestructurales frente a las que no fueron sometidas a este proceso. Aplicando este método de aislamiento y el protocolo de fijación C (baja concentración de glutaraldehído en tampón de lavado) optimizamos aún más la estructura plaquetaria como se demuestra por los análisis morfométricos y estereológicos realizados.

2.- La medida de la longitud del eje mayor del disco es la característica morfométrica que con mayor precisión nos indica la conservación del estado inactivado de las plaquetas; por su parte los gránulos densos, mitocondrias y DTS, son las estructuras intracelulares mayormente afectadas por los procesamientos propios del estudio a M.E.

3.- El aumento del SCCS, en volumen y superficie, no es un artefacto del método de lavado de las plaquetas, sino reflejo de una mejor preservación ultraestructural obtenida al conjugar el método de aislamiento y fijación más idóneo.

4.- La caracterización del Ca^{2+} nos muestra, además de los lugares típicos de almacenamiento de este ión en las plaquetas (DTS, gránulos densos, gránulos α y mitocondrias), la existencia de un "pool" intercambiable localizado tanto en la membrana externa como en la del SCCS, que hasta hoy no había sido demostrado con claridad.

5.- La actividad ATPasa Na^+/K^+ no solo se encuentra en la membrana citoplásmica de la cubierta exterior de la plaqueta sino, como se deduce del estudio citoquímico realizado, está presente también en la membrana del SCCS. Junto a este resultado, hemos observado la presencia de actividad fosfatasa en el DTS y membrana de gránulos α que podrían ser reflejo, respectivamente, de las actividades ya conocidas como ATPasa- Ca^{2+} y ATPasa- H^+ .

6.- Se estandariza un método citoquímico para la detección de la actividad cAMPasa por paso único y en condiciones óptimas de pH. Esta actividad se detecta en la cara interna de la membrana del DTS y es inhibida específicamente por

trombina. Asimismo hemos podido comprobar citoquímicamente el efecto inhibitor, descrito bioquímicamente con anterioridad, producido por bajas concentraciones de forskolina.

BIBLIOGRAFIA

- AKERMEN, K.E. (1982): Ca^{2+} -transport and cell activation. Medical Biol. 60:168-182.
- AKTORIES, K. y JAKOBS, K.H. (1984): N_1 -mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase by thrombin. Eur. J. Biochem. 145:333-338.
- AKTORIES, K. y JAKOBS, K.H. (1985): Regulation of platelet cyclic AMP formation. En: The platelets: physiology and pharmacology. Ed. Academic Press, Inc. New York, pg. 271-287.
- ALBERTS, R.W. y KOVAL, G.J. (1972): Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase VII. Concurrent inhibition of Na^+ - K^+ -adenosine triphosphate and activation of K^+ -nitrophenylphosphatase activities. J. Biol. Chem. 247:3088-3092.
- ALLEN, R.D.; ZACHARSKI, L.R.; WIDIRSTKY, S.T.; ROSENSTEIN, R.; ZAITLIN, L.M. y BURGESS, D.R. (1979): Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and lectron microscopy. J. Cell Biol. 83:126-142.
- ANDO, T.; FUJIMOTO, K.; MAYAHARA, H.; MIYAJIMA, H. y OGAWA, K. (1981): A new one step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca^{2+} ATPase activity. Acta Histochem. Cytochem. 14:705-726.
- ANDREW, W. y HICKMAN, C.P. (1974): Histology of the vertebrates. C. V. Mosby Co.
- ASTER, R.H. (1966): Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. J. Clin. Invest. 45: 645-657.

- BARNHART, M.I. y LUSHER, J.M. (1975): Splenic structural physiology in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. En : Platelets Recents Advances in Basic Research and Clinical Aspects. Eds. Ulutin, O.N. y Jones, J.V.. Excerpta medica. Amsterdam, pg. 393-402.
- BARNHART, M.I. y NOONAN, S.M. (1978): Fine structure and surface features of platelets and megakaryocytes. *Suppl Thromb. Haemostas.* 63:3-36.
- BEARER, E.L. y FRIEND, D.S. (1986): Lipids of the platelet membrane. *Lab. Invest.* 54:119-121.
- BENTFELD-BARKER, M.E. y BAINTO, D.F. (1975): Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. *J. Clin. Invest.* 56:1635-1639.
- BENTFELD-BARKER, M.E. y BAINTON, D.F. (1982): Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* 59:472-480.
- BERRIDGE, M.J. (1984): Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220:345-360.
- BESSIS, M. y BRETON-GORIUS, J. (1965): Les microtubules et les fibrilles dans les plaquettes etalees. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 5:657-662.
- BIZZOZERO (1882): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- BLACHE, D.; CIAVATTI, M.; PONSIN, G. y NARGEOT, J. (1987): Direct evidence for the modulation of human platelet cytosolic free Ca^{2+} by intracellular cyclic AMP produced with a photoactivable derivative. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 146:321-331.
- BORGERS, M.; THONE, F.; VERHEYEN, A. y TERKEURS, H.E.D.J. (1984): Localization of calcium in skeletal and cardiac muscle. *Histochem. J.* 16:295-309.
- BOSKEY, A.L. y POSUER, A.S. (1982): Optimal concentrations for Ca^{2+} -acidic phospholipid- PO_4 formation. *Calcif. Tiss. Int.* 34:S1-S7.
- BRASS, L.F. (1985): Ca^{2+} -transport across the platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 260:2231-2236.
- BRETON-GORIUS, J. y GUICHARD, J. (1975): Two different types of granules in megakaryocytes and platelets as revealed by the diaminobenzidine reaction. *J. Micros. Biol.* 23:197-202.

- CARON, J.M. y BERLIN, R.D. (1979): Interaction of microtubule proteins with phospholipid vesicles. *J. Cell. Biol.* 81:665-671.
- CLEMETSON, K.J. (1985): Glycoproteins of the platelet plasma membrane. En: *Platelet Membrane Glycoproteins*. Eds. George, J.N.; Nunden, A.T. y Phillips, D.R.. Plenum Publish. Cor., pg. 51-84.
- COURTENS, J.L. y FOURNIER-DELPECH, S. (1979): Modifications in the plasma membranes of epididymal rat spermatozoa during maturation and incubation in utero. *J. Ultrastruc. Res.* 68:163-169.
- CUTLER, L.S. (1983): Cytochemical methods for the localization of adenylate cyclase: A review and evolution of the efficacy of the procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 31:85-93.
- CUTLER, L.S. y CHRISTIAN, C.P. (1980): Cytochemical localization of adenylate cyclase. *J. Histochem. Cytochem.* 28:62-65.
- CUTLER, L.S.; CHRISTIAN, C.P. y FEINSTEIN, M.B. (1985): Cytochemical localization of adenylate cyclase in the dense tubule system of human blood platelets stimulated by forskolin, prostacyclin and prostaglandin D₂. *Biochem. Biophys. Acta* 845:403-410.
- CUTLER, L.S.; FEINSTEIN, M.B. y CHRISTIAN, C.P. (1980): Cytochemical localization of ouabain sensitive K⁺-dependent p-nitrophenilphosphatase (transport ATPase) in human blood platelets. *J. Histochem. Cytochem.* 28:1183-1188.
- CUTLER, R.S.; FEINSTEIN, M.B.; RODAN, G.A. y CHRISTIAN, C.P. (1981): Cytochemical evidence for the segregation of adenylate cyclase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase, K⁺-dependent p-nitrophenilphosphatase in separate membrane compartments in human platelets. *Histochem. J.* 13:547-554.
- CUTLER, R.S.; RODAN, G. y FEINSTEIN, M.B. (1978): Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPase in the dense tubules system of human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 542:357-371.
- DAIMON, T.; Mizuhira, V. y UCHIDA, K. (1978): Ultrastructural localization of calcium around the membrane of the surface connected system in the human platelets. *Histochemistry* 55:271-279.

- DAPRADA, M.; RICHARDS, J.G. y KETTLER, R. (1981): En : Platelets in Biology and Pathology. Ed. Gordon, J.L.. Elsevier. North-Holland. New York, pg. 107-145.
- DAVID-FERREIRA, J.F. (1964): The blood platelet. Electron Microscopic Studies. Int. Rev. Cytol. 17:99-148.
- DEAN, L.V. y SULLIVAN, D.M. (1982): Structural and functional properties of a Ca^{2+} -ATPase from human platelets. J. Biol. Chemistry 257:14390-14394.
- DONNE, A. (1842): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- DUYVENE, L.J.; BADENHORST, P.N. y HEYENS, A.P. (1987): Ultrastructural morphometry observations on serial sectioned human blood platelet subpopulations. Eur. J. Cell Biol. 43:408-411.
- ERNST, S.A. (1972a): Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. I. Biochemical characterization of a cytochemical medium for the ultrastructural localization of ouabain sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the avian salt gland. J. Histochem. Cytochem. 20:13-22.
- ERNST, S.A. (1972b): Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. II. Cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in secretory epithelium of the avian salt gland. J. Histochem. Cytochem. 20:23-38.
- ERNST, S.A. y HOOTMAN, S.R. (1981): Microscopical methods for the localization of Na^+, K^+ -ATPase. Histochem. J. 13:397-418.
- ESCOLAR, G.; SCUK, J.; BRAVO, M.L.; KRUMWIEDE, M. y WHITE, J.G. (1987): Immunological staining of microtubules in resting and activated platelet. Am. J. Hematol. 24:177-188.
- FOX, J.E.B.; BOYLE, J.K.; REYNOLS, C.C. y PHILLIPS, D.R. (1984): Actin filament content and organization in unstimulated platelets. J. Cell. Biol. 98:1985-1991.
- FOX, J.E.B. y PHILLIPS, D.R. (1986): Actin-membrane interactions in platelets. En: Membrane skeletons and cytoskeletal-membrane associations. Alan R. Liss Inc., New York, pg 281-292.
- FROJMOVIC, M.M. y MILTON, J.G. (1982): Human platelet size, shape and related functions in health and disease. Physiol. Rev. 62:185-261.

- FROJMOVIC, M.M. y MILTON, J.G. (1983): Physical, chemical and functional changes following platelet activation in normal and "giant" platelets. *Blood Cells* 9:359-382.
- FROJMOVIC, M.M. y PANJWANI, R. (1976): Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys. J.* 16:1071-1089.
- FUKAMI, M.H. y SALGANICOFF, L. (1977): Human platelets storage organelles. A review. *Thromb. Haemostas.* 38:963-971.
- GERRARD, J.M.; PETERSON, D.A. y WHITE, J.G. (1981): Platelets in biology and pathology. Ed. Gordon, J.L. Elsevier North-Holland Biochemical Press. Amsterdam. pg 407-436.
- GERRARD, J.M. y WHITE, J.G. (1978): Prostaglandins and thromboxanes: "Middlemen" modulating platelet function in hemostasis and thrombosis. *Prog. Hemost. Thromb.* 4:87-125.
- GLYNN, I.M. (1985): The Na^+ - K^+ -transporting adenosine triphosphatase. En: *The enzyme of biological membranes.* Ed. Martonosi, A.N. Plenum Press. New York. pg 35-114.
- GOGSTAD, G.O.; HAGEN, I.; KORSMO, R. y SOLUM, N.O. (1981): Characterization of the proteins of isolated human platelet α -granules. Evidence for a separate α -granule-pool of the glycoprotein IIb and IIIa. *Biochem. Biophys. Acta* 689:150-162.
- GONZALEZ-UTOR, A.L. y LOPEZ-CAMPOS, J.L. (1987): Aspectos morfológicos de las plaquetas lavadas y sus diferencias bajo la acción del Dipiridamol y AAS/Dipiridamol. *Sangre* 32:161-174.
- GRINSTEIN, S. y FURUYA, W. (1982): A Mg^{2+} -stimulated ATPase in platelet α -granule membrane: Possible involvement in proton translocation. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:502-512.
- GRINSTEIN, S. y FURUYA, W. (1983): The electrochemical H^+ gradient of platelet secretory α -granules. Contribution of a H^+ pump and Donnan potential. *J. Biol. Chem.* 258:7876-7882.
- GROSS, R. y SCHNEIDER, W. (1971): Energy metabolism. En: *The circulating platelet.* Ed. Johnson, S.A.. Acad. Press. New York, pg 123-152.
- HANOUNE, J.; HENRY, D. y STENGEL, D. (1985): The adenylate cyclase system. En: *Regulator y peptides in digestive, nervous and endocrine systems.* Eds. Lewis, M.J.M. y

- Bonfils, S. Elsevier Science Publishers B.V., pg 123-131.
- HAYEN, G. (1877): Citado por David-Ferreira J.F., 1964.
- HOLME, R.; SIXMA, J.J.; y MURER E.H. (1973): Demonstration of platelet fibrinogen secretion via the surface connecting system. *Thromb. Res.* 3:347-351.
- JAKOBS, K.H.; WATANABE, S. y BAVER, S. (1986): Interactions between the hormone-sensitive adenylate cyclase system and the phosphoinositide-metabolizing pathway in human platelets. *J. Cardiovascular Pharm.* 8:561-564.
- JAY, A.W.L. (1975): Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys. J.* 15:205-222.
- KARPATKIN, S. (1969): Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.* 48:1073-1082.
- KRETSINGER, R.H. (1979): The informational role of calcium of the cytosol. En: *Advances in Cyclic Nucleotides Research*. Eds. Greengard, P. y Robinson, G.A. Raven Press. New York, pg 1-26.
- KVINNSLAND, S. (1979): Adenylate cyclase cytochemistry: methodological evaluation. *Histochem. J.* 11:669-684.
- LANZA, F.; BERETZ, A.; STIERLE, A.; CORRE, G. Y CAZENAVE, J.P. (1987): Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors prevent aggregation of human platelets by raising cyclic AMP and reducing cytoplasmic free calcium mobilization. *Thromb Res.* 45:477-484.
- MAYAHARA, H.; FUJIMOTO, K.; ANDO, T. y OGAWA, K. (1980): A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity. *Histochemistry* 67: 125-138.
- MAYAHARA, H. y OGAWA, K. (1980): Ultrastructural localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity in the rat kidney. *Acta Histochem. Cytochem.* 13: 90-102.
- METZ, M.; ENOUF, J.; LEBRET, M. y LEVY-TOLEDANO, S. (1984): The Ca^{++} uptake and the hidrolisis of various nucleotide triphosphates by human platelet membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 773: 325-328.
- MILTON, J.G. y FHOJMOVIC, M.M. (1979): Invaginated plasma membrane of human platelets: Evagination and

- measurement in normal and "giant" platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 93: 162-170.
- MILTON, J.G. y FROJMOVIC, M.M. (1983): Sex-related differences in platelet morphology in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). *Thrombosis Res.* 30: 595-607.
- MILTON, J.G.; GLUSHAK, C.; WONG, T. y FROJMOVIC, M.M. (1981): Comparison of the time course for ADP-induced shape change, aggregation and onset of refractoriness. *Thromb. Haemostasis (abs)* 46: 408.
- MORGENSTERN, E. y JANZARIK, H. (1977): The microtubular cytoskeleton in avian thrombocytes and human blood platelets and its correlations to certain organelles. *Mikroskopie (Wien)* 33: 47-57.
- MORGENSTERN, E. y JANZARIK, H. (1985): Comparative ultra-cytochemical studies on the organelles of avian thrombocytes and human blood platelets. *Acta Histochem. Suppl.* 5: 207-210.
- NIEWIAROWS, K.I. y HOLT, J.C. (1985): Platelet α -granules proteins: Biochemical and pathological aspects. En: *The platelets: Physiology and pharmacology.* Acad. Press Inc., New York. pg 49-83.
- NORTHOVER, A.M. (1985): The release of membrane-associated calcium from rabbit neutrophils by fixatives. Implications for the use of antimoniate staining to localize calcium. *Histochem. J.* 17:443-452.
- OSLER, W. (1874): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- PANIAGUA, R. y NISTAL, M (1983): *Introducción a la Histología Animal Comparada.* Ed. Labor. Barcelona.
- PATSCHKE, H. (1981): Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10:14-27.
- PATSCHKE, H. y WÖRNER, P. (1978): Platelet activation detected by turbidometric shape-change analysis. Differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E₁. *Thromb. Res.* 12:485-496.
- PENINGTON, D.G.; STREATFIELD, k. y ROXBURG, A.E. (1976): Megakaryocytes and the heterogeneity of circulating platelets. *Br. J. Haematol.* 34:639-653.
- PENNY, R.; ROZENBERG, M.C. y FIRKIN, B.G. (1966): The splenic platelet pool. *Blood* 27:1-16.

- PERRET, B.; CHAP, H.J. y DOUSTE-BLAZY, L. (1979): Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochem. Biophys. Acta* 556:434-446.
- PLATT, W.R. (1982): Trombocitos: recuentos de plaquetas. *Atlas de Hematología*. Ed. Jims, S.A. Barcelona. pg 279-293.
- POEGGEL, G.; LUPPA, H.; BERNSTEIN, H.G. y WEISS, J. (1984): Histochemistry of adenylate cyclase. *Int. Rev. Cytol.* 89:35-64.
- POLLEY, M.J.; LEUNG, LL.K.; CLARK, F.Y. y NACHMAN, R.L. (1981): Thrombin-induced platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa complex formation: an electron microscopy studies. *J. Exp. Med.* 154:1058-1068.
- RATTO, L.A.; DEPIANTE, M.E. y YANTORNO, C.E. (1970): Numeración de plaquetas: análisis estadístico comparativo de algunas métodos y expresión de valores normales. *Sangre* 15: 383-392.
- REIMERS, H.J. (1985): Adenine nucleotides in blood platelets. En: *The Platelets: Physiology and Pharmacology*. Ed. Academic Press. New York. pg, 85-111.
- REYNOLDS, E.S. (1962): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-213.
- ROTMAN, A. (1985): Platelet membrane electrical potential. Its regulation and relationship to platelet activation. En: *Platelet membrane glycoproteins*. Ed. George, J.N.; Nurden, A.T. y Phillips, D. Plenum Publishing Co. New York. pg, 129-141.
- SATO, T.; HEKMAN, L.; CHANDLER, J.A.; STRACHER, A. y DETWILER, T.C. (1975): Localization of a thrombin-sensitive calcium pool in platelets. *J. Histochem. Cytochem.* 23:103-106.
- SCHULTZE, M. (1965): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- SIFFERT, W.; SIFFERT, G. y SCHEID, D. (1987): Activation of Na^+/H^+ exchange in human platelets stimulated by thrombin and a phorbol ester. *Biochem. J.* 241:301-303.
- SIMSON, J.A.V.; SPICER, S.S. y KATSUYAMA, T. (1980): Cell membrane cation localization by pyroantimonate methods: Correlation with cell function. En: *Pathobiology of cell membranes*. vol. II. Eds. Trump, B.F. y Arstilla, A.V.. Academic Pres. New York. pg, 1-39.

- SKJØRTEN, F. (1968): Studies on the ultrastructure of pseudopod formation in human blood platelets, I. Effect of temperature, period of incubation, anticoagulants and mechanical forces. *Scand. J. Haematol.* 5:401-414.
- SPURR, A.R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.* 26:31-37.
- STAHL, K.; THEMANN, M. Y DAME, W.R. (1978): Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets. *Haemostasis* 7:242-251.
- STATLAND, B.E.; HEAGAN, B.M. y WHITE, J.G. (1969): Uptake of calcium by platelets relaxing factor. *Nature* 223:521-522.
- STEINER, B. y LUSCHER, E.F. (1985): Evidence that the platelet plasma membrane does not contain a (Ca^{2+} + Mg^{2+})-dependent ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 818:299-309.
- TAVASSOLI, M. (1980): Megacaryocytes-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood* 55:537-545.
- THIERY, J.P. (1967): Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J. Microscop.* 6:987.
- THOMPSON, C.B. (1985): Selective consumption of large platelets during massive bleeding. *Brit. Med. J.* 291: 95-96.
- THOMPSON, C.B. (1986): From precursor to product: How do megakaryocytes produce platelets?. En: *Megakaryocyte development and function*. Ed. Alan R. Liss. New York. pg 361-367.
- THOMPSON, C.B.; JAKUBOWSKI, J.A.; QUINN, P.G.; DEYKIN, D. y VELERI, C.R. (1983): Platelet size as a determinant of platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* 101: 205-213.
- THOMPSON, N.T. y SCRUTTON, M.C. (1985): Intracellular calcium fluxes in human platelets. *Eur. J. Biochem.* 147: 421-427.
- TZAGOLOFF, A. (1982): Mitochondria. En: *Cellular organelles*. Plenum Press. New York y Londres.
- UENO, S.; MAYAHARA, H.; UECK, M.; TSUKAHARA, J. y OGAWA, K. (1983): Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase

activity in the lacrimal gland of the rat. *Cell Tissue Res.* 243: 497.

- VAINER, H.; JEANNEU, C. y CAEN, J. (1970): Étude sur la biosynthèse du glycogène plaquettaire. IV. L'État du glycogène particulaire des plaquettes sanguines humaines. *J. Microscopie* 9: 741-748.
- VILEN, L.; FREDEN, K. y KUTTI, J. (1980): Presence of a non-splenic platelet pool in man. *Scand. J. Haematol.* 24: 137-141.
- VULPIAN, A. (1873): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- WALSH, R.T. y BARNHART, M.I. (1969): Clearance of coagulation and fibrinolysis products by the reticuloendothelial system. *Thromb. Diathes. Haemorrh. Suppl.* 36: 83-97.
- WATANABE, Y. y JAKOBS, K.H. (1986): Inhibition of Ns-stimulated human platelet adenylate cyclase by forskolin. *Mol. Pharmacol.* 29: 258-263.
- WATSON, S.P.; McCONNEL, R.T. y LAPETINA, E.G. (1984): The rapid formation of inositol phosphates in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin. *J. Biol. Chem.* 259: 13199-13203.
- WEIBEL, E.R. (1979): *Stereological methods. Vol. I y II.* Academic Press. New York.
- WEIBEL, E.R.; STAUBLI, W.; GNÄGI, H.R. y HESS, F.A. (1969): Correlated morphometric and biochemical studies on the liver. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell. Biol.* 42: 68-77.
- WELSCH, V. y STORCH, V. (1976): *Estudio comparado de la citología e histología animal.* Ed. Urmo. Bilbao.
- WERNER, G. y MORGENSTERN, E. (1980): Three-dimensional reconstruction of human blood platelets using serial sections. *Eur. J. Cell. Biol.* 20: 276-282.
- WHITE, J.G. (1969): The submembrane filaments of blood platelets. *Am. J. Pathol.* 56: 267-277.
- WHITE, J.G. (1971a): Platelet morphology. En: *The circulating platelets.* Ed. Johnson, S.A. Academic Press. New York. pg 45-121.
- WHITE, J.G. (1971b): The ultrastructural, cytochemistry and physiology of blood platelets. En: *The platelet.* Eds.

- Mostafi, F.K. y Brinkhous, K.M. Williams and Wilkins. Baltimore. pg 83-115.
- WHITE, J.G. (1972): Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am. J. Pathol.* 66: 295-312.
- WHITE, J.G. (1975): Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum?. *Hemostasis* 4: 185-191.
- WHITE, J.G. (1983): Ultrastructural physiology of platelets with randomly dispersed rather than circumferential band microtubules. *Am. J. Pathol.* 110: 55-63.
- WHITE, J.G. (1984): The ultrastructure and regulatory mechanism of blood platelets. En: *Blood platelet function and medical chemistry*. Ed. Lasslo, A. Elsevier Biochemical. New York. Amsterdam. Oxford. pg 15-59.
- WHITE, J.G. y CLAWSON, C.C. (1980): The surface-connected canalicular system of blood platelets. A fenestrated membrane system. *Am. J. Pathol.* 101: 353-364.
- WHITE, J.G. y GERRARD, M.D. (1978): Platelet ultrastructure in relation to platelet function. En: *The blood platelet in transfusion therapy*. Ed. Alan R. Liss. New York. pg 5-23.
- WICK, S.M. y HEPLER, P.K. (1982): Selective localization of intracellular Ca^{2+} with potassium antimoniate. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 1190-1204.
- WOLPERS, C. y RUSKA, H. (1939): Strukturenuntersuchungen zur blutgerinnung. *Klin. Wochenschs.* 18: 1111-1132.
- WRIGHT, J.H. (1906): Citado por David-Ferreira, J.F., 1964.
- ZUCKER-FRANKLIN, D. (1978): Ultrastructure of the fibrillar proteins in platelets. *Supp. Tromb. Haemostas.* 63:37-47.
- ZUCKER-FRANKLIN, D. (1981): Endocytosis by human platelets: Metabolic and free-fracture studies. *J. Cell Biol.* 91:706-712.
- ZUCKER-FRANKLIN, D.; BENSON, K.A. y MYERS, K.M. (1985): Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* 65:241-244.
- ZUCKER-FRANKLIN, D. y PETURSSON, S. (1984): Thrombocytopoiesis. Analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *J. Cell Biol.* 99:390-402.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de D. *Antonio Luis González Vtor* titulada "*Método de aislamiento y fijación de plaquetas humanas. Estudio morfométrico, histológico y citogénico.*" acordó otorgarle la calificación de **APTO "CUM LAUDE"**

Sevilla, 23 de Junio 1989

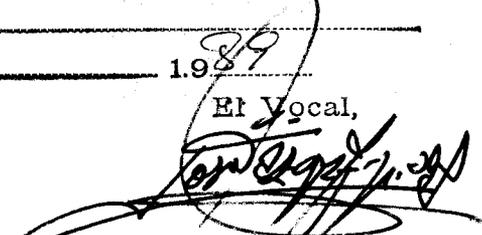
El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,


El Presidente

Rafael Correas
El Secretario,


El Doctorado,

José María Moreno

[Signature]

[Signature]



500595082

FBI E TD-191

595082