

Estudio de la fibronectina plasmática en niños diabéticos insulino dependientes

A. BLANCO, C. BLANCO, F. HERMOSO y F. J. GUIASOLA

RESUMEN: En los adultos diabéticos de larga evolución que presentan complicaciones vasculares se han descrito tasas elevadas de fibronectina (FN) plasmática. Nosotros estudiamos 35 niños diabéticos con edades entre 3-15 años (media $9,6 \pm 2,2$), de los que 10 se hallan al comienzo de la enfermedad y los otros 25 tenían una evolución de 1-11 años. La FN plasmática en los enfermos fue de $24,0 \pm 9,4$ mg/dl, similar a la del grupo control ($27,5 \pm 5,9$ mg/dl). El grupo estudiado al comienzo de la enfermedad tenía una FN ligeramente mas alta ($26,5 \pm 8,3$ mg/dl) que los niños con más de 4 años de evolución ($21,6 \pm 8,5$ mg/dl), pero la diferencia no fue significativa ($p > 0.2$). Únicamente dos enfermos tenían una leve microangiopatía por lo que no se pudieron obtener conclusiones. Se compararon dos técnicas distintas para determinar FN, electroinmunodifusión de Laurell y inmunodifusión radial, que mostraron unos resultados globales similares ($r: 0.520$, $p < 0.0001$) pero con un coeficiente de variabilidad del 14,78 % y un rango de + 45-50 %. En la diabetes infantil todavía no hay modificaciones de la FN, aunque es posible que su determinación sea útil en el adulto joven para el diagnóstico precoz del daño vascular y renal. PALABRAS CLAVE: DIABETES, FIBRONECTINA, MICROANGIOPATÍA, NEFROPATÍA DIABÉTICA.

PLASMA FIBRONECTIN STUDY IN INSULIN-DEPENDENT DIABETIC CHILDREN. (SUMMARY): Elevated plasma levels of fibronectin (FN) have been reported in adult diabetics with a long follow-up. We studied 35 diabetic children 3-15 years old (mean $9,6 \pm 2,2$), 10 of them at the onset and the other 25 with a evolution from 1-11 years. The plasma FN was $24,0 \pm 9,4$ mg/dl in patients, similar to normal group ($27,5 \pm 5,9$ mg/dl). The group of patients studied at onset has a higher plasma FN ($26,5 \pm 8,3$ mg/dl) than patients with more than 4 years follow-up ($21,6 \pm 8,5$ mg/dl), although this difference was not significant ($p > 0.2$). Only two patients have microangiopathy, so no conclusions could be obtained. Two different techniques for measuring FN, Laurell's electroimmunoassay and radial immunodiffusion, were compared and although total results were similar ($r: 0.520$, $p < 0.0001$) the variability coefficient was 14,78 % with a range from + 45 to-50 %. The results suggest that in the infantile diabetes there was not plasma FN modifications yet, but its determination was probably useful in young adult for establishing an early diagnosis of vascular and renal damage. KEY WORDS: DIABETES, FIBRONECTIN, MICROANGIOPATHY, DIABETIC NEPHROPATHY.

INTRODUCCIÓN

La fibronectina (FN) se conocía desde hace años, aunque con otros nombres, co-

mo el de «globulina insoluble en frío». Se encuentra tanto en los tejidos unida a la superficie celular, como en forma soluble en el plasma (1, 2). Es sintetizada funda-

mentalmente en el hígado y en las células endoteliales, por lo que las lesiones vasculares podrían alterar sus niveles plasmáticos, sin embargo también es fabricada por otras muchas células, especialmente en situaciones de agresión (3). Una revisión más detallada de la FN fue anteriormente publicada por nosotros en esta revista (4).

Aunque las funciones biológicas de la FN no son totalmente conocidas, se sabe que actúa como ligando de numerosas moléculas plasmáticas (fibrina, colágeno, actina, heparina, ADN, etc.) y de diferentes células (polinucleares, plaquetas, etc.). Participa en la respuesta inmunológica, uniéndose al Clq e inmunocomplejos, y facilitando la adhesión, opsonización y fagocitosis (5, 6).

A nivel tisular es fundamental en la cicatrización de las heridas reorganizando los fibroblastos. Individuos con déficit congénito heterocigoto de FN presentaron cicatrices queloides (7). Se cree que también desempeña un importante papel en los fenómenos de infiltración y metástasis tumoral, al menos en los estadios precoces; estando presente en la superficie de algunas células cancerosas y no de otras.

A nivel vascular su principal función consiste en fijarse a la fibrina y a las plaquetas, participando en el cierre de las heridas y luego en la cicatrización de los vasos. Además al activar la fagocitosis de los restos trombóticos contribuye a mantener la permeabilidad y la integridad microvascular. Fuera del período neonatal, la FN plasmática está descendida principalmente en sepsis y graves traumatismos (8).

En diabéticos adultos se comunicaron niveles normales o elevados en los enfermos bien controlados y disminuciones durante las fases de cetoacidosis. Al contrario, se publicaron elevaciones de la FN en los enfermos con microangiopatía.

En este artículo estudiamos los niveles de FN plasmática en niños diabéticos, comparando los resultados de acuerdo al momento evolutivo y a la dosis de insulina necesaria para su control.

MÉTODOS

Pacientes. Fueron estudiados 35 diabéticos tipo I (15 niños y 20 niñas) con edades entre 3-15 años, siendo la media $9,6 \pm 2,2$ años; 10 casos fueron estudiados en el momento del diagnóstico, antes de comenzar la administración de insulina, mientras que los 25 restantes llevaban de 1-11 años de evolución. La cantidad de insulina que necesitaban para su control, fue de $0,48 \pm 0,35$ uu/kg/día. En el momento del estudio ninguno de los pacientes estaba recibiendo ninguna otra medicación. Así mismo, todos los estudios se realizaron fuera de situaciones cetoacidóticas. Sólo 2 casos (n.º 33 y 35) sufrían lesiones microvasculares, retinopatías simples de muy escasa intensidad.

Los resultados de la FN hallados en los enfermos diabéticos se compararon a los obtenidos en un grupo control compuesto por 26 niños normales con edades comprendidas entre 1 y 8 años, cuyos plasmas fueron también recogidos de forma similar con citrato.

Determinación de fibronectina. La FN se midió por la técnica de electroinmuno-difusión (EID) descrita por Laurell (9). Se utilizó antisuero anti-FN humana obtenido en oveja (Serotec) con una concentración de 500 mg de anticuerpo/l., conteniendo 0,1 % de azida sódica y 0,01 % de tiomersal y se usaron patrones de FN 25 mg/dl (Serotec). Se hicieron varios ensayos hasta conseguir las condiciones óptimas, que fueron las siguientes.

— Antisuero, 65 μ l/7,5 ml de agarosa (0.86 % v.v.)

- Plasmas: diluidos al 1/3
- Patrones: 12,50; 6,25 3,12 mg/dl

Se tomó como referencia una muestra que se determinó en 6 placas distintas, obteniéndose un coeficiente de variabilidad interensayo de 13,7 %. Las diluciones de los plasmas se hicieron en buffer veronal pH 8.6 justo antes de la prueba.

La agarosa se preparó al 1 % en buffer veronal, fundiéndose a 56°C y derramándola sobre portas de cristal 70 × 100 mm. situado en una superficie nivelada horizontalmente. Se dejaron enfriar en nevera a 5°C durante 1-2 horas. Luego se tallaron los pocillos del tamaño adecuado para la aplicación de 4 µl de las muestras. Una vez colocados los controles y las muestras, se pusieron las placas en la cubeta de electroforesis aplicándose una corriente de 40 v. durante 18 horas.

Una vez terminada la electroforesis las placas se lavaron 24-36 h. en suero salino para eliminar las proteínas no precipitadas. Generalmente las líneas eran visibles sin necesidad de tinción, pero se tiñeron para medirlas con más exactitud y poder conservarlas. Después del lavado, se prensaron con un peso de 2-3 kg y se terminaron de secar con un secador de mano eléctrico. Se tiñeron 10 min. con azul coomasia y se destiñeron 12-24 h. con una solución de lavado compuesta por metanol, acético y agua.

Se midió la longitud de los «rockets» y con los datos de los patrones se construyó una línea recta en papel logarítmico. Las longitudes de las muestras se llevaron a esa gráfica por interpolación se obtuvo el valor en mg/dl que era multiplicado por el factor de dilución (x3).

En 26 enfermos en 42 controles se repitió la determinación de FN plasmática mediante un test comercial de inmunodi-

fusión radial con el fin de hacer una comparación entre los dos métodos.

Para los estudios estadísticos se utilizaron las pruebas no-paramétricas de Spearman y de Mann-Whitney, para valorar, respectivamente, la correlación y la diferencia entre grupos con datos no apareados.

RESULTADOS

Estudio de los enfermos. Los niveles de FN plasmática en los diabéticos fue de $24,0 \pm 9,4$ mg/dl (Tabla I) y no diferían de los hallados en el grupo control: $27,3 \pm 5,9$ (Tabla II). En el grupo estudiado en el momento del diagnóstico la cifra de FN fue ligeramente más alta ($26,5 \pm 8,3$ mg/dl) que en los diabéticos con más de 4 años de evolución y que ya recibían insulina ($21,6 \pm 8,5$ mg/dl), pero sin que esta diferencia tuviera tampoco valor estadístico ($p > 0.2$). Por otra parte, tampoco hallamos correlación de la FN con el tiempo de evolución de la enfermedad ($r: 307$; $p > 0.05$) (Fig. 1) ni con las necesidades de insulina ($r: 0.348$; $p > 0.05$) (Fig. 2). Un enfermo con retinopatía tenía una cifra de FN de 12 mg/dl, muy inferior a la media, con uno de los valores más bajos de toda la serie. Sin embargo por el escaso número de casos con lesión vascular no se sacaron conclusiones.

Comparación de las dos técnicas. La cifra media de las 68 determinaciones fue casi exactamente igual ($19,42 \pm 8,65$ mg/dl con EID y $19,01 \pm 6,13$ con IDR) con una correlación positiva ($r: 0.520$ y $p < 0.0001$) (Fig. 3 y Tabla III). La coincidencia de los valores individuales fue muy inferior a la que mostró la media del grupo, con un coeficiente de variabilidad de 14,78 % y rangos de $\pm 45-50$ % (Fig. 4); no obstante este coeficiente fue aproximadamente el mismo que ya habíamos determinado para la variabilidad interensayo en la prueba de EID (13,7 %).

TABLA I. FIBRONECTINA (FN) PLASMÁTICA EN NIÑOS DIABÉTICOS

CASO n.º	EVOLUCIÓN años	INSULINA uu/kg/día	FN (EID) mg/dl	FN (IDR) mg/dl
1	0	0	38	23,2
2	0	0	14	15
3	0	0	17	13
4	0	0	28	13,5
5	0	0	28	18,8
6	0	0	27	25,2
7	0	0	19	11,5
8	0	0	33	N.R.
9	0	0	35	18,5
10	0	0	24	20,2
11	1	0,50	22	34,6
12	1	0,53	10	12,2
13	1	0,70	16	N.R.
14	1	0,70	26	N.R.
15	1	0,85	14	12,5
16	2	0,55	29	27,2
17	2	0,57	19	N.R.
18	2	0,60	24	N.R.
19	2	0,70	21	19,8
20	3	0,50	22	14
21	3	0,53	30	N.R.
22	3	0,60	38	N.R.
23	3	0,70	54	20,3
24	3	0,74	26	N.R.
25	3	0,78	13	18,8
26	4	0,66	36	32,6
27	4	0,67	18	16,8
28	4	0,82	14	31
29	4	0,85	16	12,1
30	5		13	22
31	6	0,75	30	19,2
32	8	0,50	24	24
33	9	0,70	21	N.R.
34	9	0,80	32	29,2
35	11	0,95	12	13
Media	2,71	0,48	24,09	19,93
Desv. St.	2,92	0,33	9,42	6,80

* N.R.: No realizado.

** Técnicas: Electroinmunodifusión (EID), inmunodifusión radial (IDR).

TABLA II. FIBRONECTINA EN DIABÉTICOS SEGÚN TIEMPO DE EVOLUCIÓN

GRUPO	n.º	FN (EID)*
Al diagnóstico	10	26,5 ± 8,3
Evolución > 4 años	10	21,6 ± 8,5
Controles normales	26	27,3 ± 5,9

* Diferencias no significativa ($p > 0.05$).

TABLA III. COMPARACIÓN DE 2 TÉCNICAS PARA DETERMINAR FIBRONECTINA UTILIZADAS EN LOS MISMOS 68 PLASMAS

TÉCNICA	MEDIA ± DESV. St.
Electroinmunodifusión	19,42 ± 8,65 mg/dl
Inmunodifusión radial	19,01 ± 6,13 mg/dl

* $r: 0.520 = p < 0.0001$

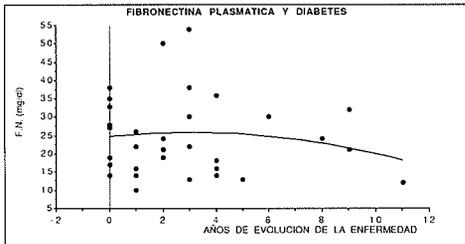


FIG. 1. La fibronectina plasmática es mayor al diagnóstico que en los diabéticos con más de 4 años de evolución, pero ni la diferencia ni la correlación es significativa ($p > 0.2$)

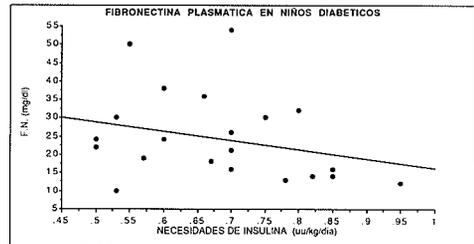


FIG. 2. Al aumentar las necesidades de insulina disminuye la fibronectina plasmática pero esta correlación no alcanza la significación estadística ($r: 0.348, p > 0.05$)

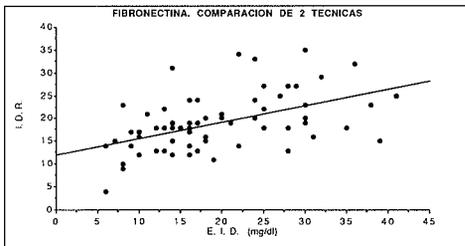


FIG. 3. La determinación de fibronectina en 68 plasmas (26 diabéticos y 42 normales) simultáneamente con las técnicas de Laurell y de inmunodifusión radial mostró una clara correlación ($r: 0.520, p < 0.0001$), aunque con una variabilidad del 14,78 % y un rango entre -17 y +24 mg/dl.

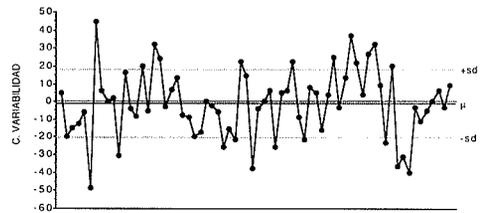


FIG. 4. La comparación de las dos técnicas para determinar fibronectina tuvo un coeficiente de variabilidad del 14,78 %, con un rango superior a ± 45 %

DISCUSIÓN

La diferencias entre las dos técnicas comparadas son explicables. La FN puede sufrir degradaciones enzimáticas tanto na-

turales, por enzimas liberadas en las situaciones patológicas, como artificiales por contaminación de los plasmas almacenados. Además la molécula puede unirse a la fibrina y a otras moléculas, formando

complejos FN-ligando de tamaño muy variable (10). Dependiendo de que la FN se halle en forma de grandes complejos de emigración lenta, o pequeños fragmentos, su difusión en la agarosa variará. En el caso de la IDR la principal variante será el peso molecular, pero en la EID de Laurell también influirá mucho la carga eléctrica. Por estas razones es normal que los resultados con ambas técnicas no coincidan. Mayor sería la diferencia si se hubieran comparado técnicas distintas de la difusión, como el ELISA o la turbidometría. Rompiendo la FN con enzimas proteolíticas se vió que los niveles de FN medidos por EID aumentaban progresivamente, mientras que disminuía en turbidometría, por lo que el uso simultáneo de estas técnicas sirve para conocer el grado de proteólisis de la FN en un determinado proceso (11). Algo similar fue propuesto usando dos sistemas distintos de ELISA para distinguir la degradación nativa artificial (12). Gracias a las antiproteasas plasmáticas, la degradación de la FN en condiciones normales, es menor en el plasma que en otros líquidos, como calostro, orina, etc., pero en procesos patológicos, como una sepsis, las antiproteasas pueden disminuir mucho.

En un artículo presentado en forma de abstract. Schwarz y col. (13) comunicaron cifras normales de FN plasmática en diabéticos adultos insulino-dependientes adecuadamente tratados y con HbA1 dentro de límites normales; sin embargo, aumentaba en los enfermos mal controlados y con HbA1 elevada. Elevaciones de FN también se hallaron en los pacientes con retinopatía (14) o con nefropatía (15), lo que apoya la relación entre microangiopatía diabética y aumento de FN.

Por el contrario, en situaciones de hiperglicemia con cetoacidosis desciende la FN en el plasma, para normalizarse pronto cuando la situación metabólica se compen-

sa (16); esto coincide con el ya conocido descenso transitorio de FN durante el ayuno.

El ejercicio físico mantenido durante 12-14 semanas ocasiona en los diabéticos un descenso del fibrinógeno y la FN aunque no se modifiquen otros parámetros como el peso corporal, colesterol, triglicéridos, plasminógeno, hematocrito antiplasma. Por consiguiente este ejercicio pudiera tener un efecto antitrombótico en los diabéticos y aunque el significado de la caída de la FN todavía está oscuro, la reducción del fibrinógeno justifica que se recomiende el ejercicio físico en los diabéticos (17).

Skrha y col. (18) estudiaron más recientemente las variaciones plasmáticas de un fragmento de la molécula de la FN que se localiza en el extremo N-terminal y tiene un PM de 30kD; demostrando su correlación con las tasas de factor von Willebrand. Quizás las variaciones de este fragmento tengan mayor significación que las de la molécula completa de FN.

Los diabéticos de larga evolución y especialmente si han sido mal controlados desarrollan con frecuencia alteraciones vasculares, origen de graves problemas en distintos órganos. Las lesiones incluyen un engrosamiento de la membrana basal con depósitos de FN, además de material PAS-positivo, laminina y colágeno tipo IV, pero con una llamativa ausencia de mucopolisacáridos (19, 20). Esta histología indica que las vasculopatías diabéticas son independientes de la aterosclerosis (19). Teniendo en cuenta las frecuentes alteraciones vasculares de los diabéticos y que gran parte de la FN se forma en el endotelio vascular, se pensó que las elevaciones plasmáticas se debería al aumento de la producción endotelial y también de su liberación plaquetaria (13, 21).

El papel de la FN en las microangiopatías diabéticas es complejo y varios autores

lo estudiaron. Rasmussen y col. (22) trataron las aortas de 23 diabéticos necropsiados con anticuerpos marcados con fluoresceína y apareció aumento de FN depositada en la túnica media, pero no en la íntima. Kolbe y col. (20) hallaron en células cutáneas de diabéticos una disminución del RNAm que codifica la síntesis de FN, actina y colágeno tipo IV. Este hallazgo, contrario a lo esperado, sugeriría que los depósitos de aquellos componentes se deben más a una reducción de la degradación que a un aumento de la síntesis. No obstante, son hallazgos que todavía precisan ser confirmados, ya que aparentemente no concuerdan con los de otros autores. Roy y col. (23) en ratones diabéticos inducidos mediante estreptozotocina encontraron un significativo aumento del RNAm que codifica la síntesis de FN en las células de la corteza renal y del corazón, mientras que nos se modifica el RNAm para actina. En los tejidos más susceptibles a padecer complicaciones diabéticas estas variaciones del RNAm persistían semanas después de normalizarse los niveles de glucosa, lo que podría ser de gran interés patogénico. Parece que el fenómeno presenta memoria funcional y que la anómala expresión genética podría acabar perpetuándose (23). Cultivando células endoteliales humanas con 30 mmol/l de glucosa también se demostró un selectivo aumento de RNAm para FN y para colágeno IV, pero no para colágeno tipo I. El efecto tardaba en aparecer, pero luego se mantenía a lo largo de múltiples pasajes celulares (24).

Los altos niveles de glucosa son necesarios y suficientes para reproducir *in vitro* las lesiones que se producen en los vasos de los enfermos diabéticos y sus efectos se realizan a través de modificaciones de la información genética (23, 24). Varios autores, en diferentes laboratorios, confirmaron que la glucosa es el estímulo concreto que hace incrementar la FN, tanto para cé-

lulas endoteliales como mesangiales. Ayo y col. (25) cultivaron células del mesangio en presencia de 10 nmol/l de glucosa y al cabo de 1 semana la FN era la proteína pericelular más abundante seguida de laminina y colágeno tipo IV. Al subir la glucosa hasta 30 nmol/l aumenta un 60 % la FN y laminina y aproximadamente un 50 % el colágeno tipo IV, por lo que aparece que la glucosa per se es la causa de los depósitos producidos alrededor de las células mensajales (25).

La adhesión de los leucocitos al endotelio vascular es el primer paso de la emigración leucocitaria y es un fenómeno dramáticamente aumentado en las inflamaciones vasculares, como ocurre en la diabetes. En el endotelio hay receptores específicos que facilitan esta adhesión, principalmente el CD1/CD18 y la IL-1 es una citoquina que estimula su aparición (26). Precisamente se propuso modular esta interacción leucocito/endotelio como terapéutica anti-trombótica y antiateroesclerótica en los diabéticos (26). Además de los sistemas específicos de adhesión celular hay otras moléculas como los receptores de FN también implicados en el sistema. Sin embargo el incremento de adhesividad no se debe a alteraciones de los propios neutrófilos, porque si se utiliza la aorta de vaca como sustrato, la adhesividad está disminuida (27), pero añadiendo plasma de diabéticos se incrementa, lo que demuestra que el factor favorecedor de la adhesividad leuco-endotelial en los diabéticos se halla en el plasma o en el endotelio, pero no en los leucocitos (27).

Las plaquetas también son importantes en relación a la angiopatía diabética y la FN; igual que el endotelio, pueden formar FN. En los diabéticos, la agregación leucocitaria es normal (27) pero no la de las plaquetas que está incrementada y Ejim y col. (28) observaron que al estimularlas con trombina liberan mucha FN, aunque

la técnica de fluorescencia que utilizan no es muy adecuada para cuantificarla.

En los diabéticos complicados con neuropatía también se demostró el aumento plasmático del factor von Willebrand antigénico, fibrinógeno y FN, con una correlación negativa entre los niveles de esta última y la velocidad de conducción de los nervios sural y peroneal (29). Sin embargo la presencia concomitante de retinopatía y/o nefropatía en los 17 pacientes incluidos en el estudio sugiere que la causa primera de las variaciones de la FN sea la enfermedad microvascular.

En los diabéticos con microalbuminuria persistente la FN plasmática es más alta que en los que no la tienen (15). El aumento es independiente de la existencia de retinopatía y la correlación FN/albuminuria se mantiene después de corregir variantes como edad, sexo, duración de la diabetes, peso, HbA_{1c}, dosis de insulina, lo que demuestra su relación con la nefropatía (15). La FN plasmática podría ser un marcador precoz de la aparición de nefropatía en los diabéticos; pudiendo incluso mejorarse su utilidad si se añade la determinación de FN urinaria, lo que es detectable con técnica de ELISA, ya que existe una correlación negativa entre el aclaramiento de creatinina y FN urinaria (30).

La adhesividad de los neutrófilos al endotelio vascular puede estar implicada en la patogenia de las angiopatías del diabético, pero algunos autores apuntan que también es un mecanismo facilitante de las infecciones, al impedir la salida de los neutrófilos a los tejidos (27).

Los estudios llevados a cabo en enfermos diabéticos durante la edad pediátrica son más escasos. Muhar y col. (31) midieron la FN plasmática en 28 pacientes de 11-14 años y los resultados fueron similares a los de controles de la misma edad.

Tampoco había diferencias cuando los pacientes eran divididos en 3 grupos de acuerdo a que tuvieran una HbA_{1c} <8 %, entre 8-10 % o >10 %. El tiempo de evolución de la enfermedad no influyó en los resultados, aunque pudo haber sido poco prolongado. Además en su serie no había ningún caso que presentase microangiopatía o cetoacidosis, las dos condiciones que parecen condicionar principalmente las anomalías de la FN plasmática. Los resultados de Chiarelli y col. (32) con 38 diabéticos de 2-18 años, no complicados con cetoacidosis o retinopatía, fue similar a la nuestra. Además estos autores ni siquiera hallaron alteraciones de la FN plasmática en 5 pacientes con albuminuria.

En un estudio más reciente, realizado en Rusia con 42 niños diabéticos insulín-dependientes, el aumento de FN se observó únicamente entre los pacientes que tenían más de 5 años de evolución, estaban descompensados y eran portadores de microangiopatía (33).

En un estudio realizado por Vergara y col. (34, 35) en nuestro laboratorio se vio que en niños diabéticos con más de 5 años de evolución descendía la producción vascular del factor plasmático estimulante de la prostaciclina (PSPF). Este defecto dependía más de la duración de la enfermedad que de su gravedad porque no se correlacionó ni con los niveles de HbA_{1c}, ni con la dosis necesaria de insulina, ni con otros parámetros bioquímicos como glucemia, triglicéridos o colesterol. Probablemente la disminución de PSPF en los diabéticos se deba al agotamiento de las células endoteliales del diabético para responder a los continuos estímulos recibidos. Sin embargo, el comportamiento de la FN en los mismos enfermos no parece ser semejante al del PSPF y no descendió en relación al tiempo de evolución.

Nuestros resultados confirman los de otros autores y destacan que en los diabé-

tics infantiles, no complicados, habitualmente la FN plasmática es normal. La diferencia con resultados obtenidos en adultos con angiopatías severas o con albuminuria, sugiere que el niño todavía no ha tenido el tiempo suficiente de evolución para que aparezcan las anomalía vasculares y las

variaciones plasmáticas de FN. Es probable que un seguimiento longitudinal de la FN plasmática y urinaria, sea útil como marcador precoz de complicaciones en el diabético adulto, pero quizás todavía no en el niño.

BIBLIOGRAFIA

1. MOSESSON, M. W.; AMRANI, D. L.: *The structure and Biologic Activities of plasma fibronectin*. Blood 1980; 56: 145-158.
2. PORTUGAL, J.: *Fibronectina: Concepto y utilidad*. An. Med. Intern. 1987; 4: 317-319.
3. QUAISSI, M. A.; CAPRÓN, A.: *Fibronectines: Structures et fonctions*. Ann. Inst. Pasteur Immunol 1985; 136 C: 169-185.
4. BLANCO, A.; SOLÍS, P.; PONCE, A.: *Importancia de la fibronectina en Pediatría*. Bol. Pediatr. 1988; 29: 135-143.
5. GOUDEMAND, M.: *La fibronectine plasmatique*. Rev. Frac. Trans. Immuno Hematol. 1983; 26: 279-298.
6. KURKI, P.; VARTIO, T.; VIRTANEN, I.: *Mitogen stimulation promotes human T lymphocyte adhesion to fibronectin*. Scand. J. Immunol. 1987; 26: 645-652.
7. SHIRAKAMI, A.; SHIGEKIYO, T.; HIRAI, Y.; TAKEICHI, T.; KAWAUCHI, S.; SAITO, S.; MIYOSHI, K.: *Plasma fibronectin deficiency in eight members of one family*. Lancet 1986; 1: 473-474.
8. MOSHER, D. F.: *Cross-Linking of cold insoluble globulin by fibri-stabilizing factor*. J. Biol. Chem. 1975; 250: 6614-6621.
9. LAURELL, C. B.: *Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies*. Anal. Biochem 1966; 15: 45-52.
10. REILLY, J. T.; MACKIE, M. J.; McVERRY, B. A.: *Observations on heterogeneity of fibronectin*. Thromb. Res 1984; 33: 289-295.
11. BYKOWSKA, K.; WERGYNOWICZ, Z.; LOPACIUK, S.; KOPEC, M.: *Effect of proteolysis on quantification of plasma fibronectin concentration by two immunoassays (Electroimmunoassay and immunoturbidimetric technique)*. Thromb Haemost 1985; 53: 377-380.
12. SELMER, J.; ERIKSEN, H.; CLEMMENSEN, I.: *Native and degraded fibronectin: new immunological methods for distinction*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1983; 44: 57-63.
13. SCHWARZ, H. P.; SCHERNTHANER, G.: *Influence of metabolic long-term control (HbA1) on plasma fibronectin in insulin-dependent diabetics*. Diabetes 1982; 31 supl. 2: 24 .
14. SEGHERI, G.; DE GIORGIO, L. A.; GIRONI, A. y col.: *Diabetic retinopathy is associated with raised concentrations of plasma fibronectin*. Diabetología 1983; 25: 193 .
15. DE GIORGIO, L. A.; BARTOLOMEI, G.; GIRONI, A.; CASELLI, P.; SEGHERI, G.: *Increased plasma fibronectin concentration in diabetic patients with microalbuminuria*. Diabetes Care 1988; 11: 527-30.
16. ALEXANDER, C. M.; LUM, S. M. C.; RHODES, J.; BOARMAN, C.; NOKOLOFF, J. T.; KUMAR, T.: *Rapid increase in both plasma fibronectin and serum triiodothyronine associated with treatment of diabetic ketoacidosis*. J. Clin. Endocrinol Metab. 1983; 56: 279-282.
17. HORNSBY, W. G.; BOGGESS, K. A.; LYONS, T. J.; BARNWELL, W. H.; LAZARCHICK, J.; COLWELL, J. A.: *Hemostatic alterations with exercise conditioning in niddm*. Diabetes Care 1990; 13: 87-92.
18. SKRHA, J.; VACKOVA, I.; KVASNICKA, J.; STIBOR, V.; STOLBA, P.; RICHTER, H.; HORMANN, H.: *Plasma free-terminial fibronectin 30-Kda domain as a marker of endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus*. Eur. J. Clin. Invest. 1990; 20: 171-6.
19. LEDET, T.; HEICKENDORFF, L.; RASMUSSEN, L. M.: *Pathology of macrovascular disease*. Baillieres Clin. Endocrinol Metab. 1988; 2: 391-405.
20. KOLBE, M.; KAUFMAN, J. L.; FRIEDMAN, J.; DINERSTEIN, C.; MACKENZIE, J. W.; BOYD, C. D.: *Changes in steady-state levels of mras coding for type IV collagen, laminin and fibronectin following capillary basement membrane thickening in human adult onset diabetes*. Connect. Tissue Res. 1990; 25: 77-85.

21. MUSSO, R.; LONGO, A.; CACCIOLA, R. R.; LOMBARDO, A.; GIUSTOLISI, R.; CACCIOLA, E.: *Elevated fibronectin plasma levels in diabetes mellitus are expression of increased synthesis and release by vascular endothelium*. Thromb Haemost. 1989; 61: 150-1.
22. RASMUSSEN, L. M.; HEICKENDORFF, L.: *Accumulation of fibronectin in aortas from diabetic patients. A quantitative immunohistochemical and biochemical study*. Lab. Invest. 1989; 61: 440-6.
23. ROY, S.; SALA, R.; CAGLIERO, E.; LORENZI, M.: *Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87: 404-8.
24. CAGLIERO, E.; MAIELLO, M.; BOERI, D.; ROY, S.; LORENZI, M.: *Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose*. J. Clin. Invest. 1988; 82: 735-8.
25. AYO, S. H.; RADNIK, R. A.; GARONI, J. A.; GLASS, W. F.; KREISBERG, J. I.: *High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells*. Am. J. Pathol. 1990; 136: 1339-48.
26. WAUTIER, J. L.; SETIADI, H.; VILETTE, D.; WEILL, D.; WAUTIER, M. P.: *Leukocyte adhesion to endothelial cells*. Biochemistry 1990; 27: 425-32.
27. ANDERSEN, B.; GOLDSMITH, G. H.; SPAGNUOLO, P. J.: *Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus; the role of cellular and plasma factors*. J. Lab. Clin. Med. 1988; 111: 275-85.
28. EJIM, O. S.; BARRADAS, M. A.; MIKHAILIDIS, D. P.; POULTER, L. W.; COUMAR, A.; DANDONA, P.: *A study of platelet fibronectin immunofluorescence in peripheral vascular disease and diabetes mellitus*. Microcirc Endothelium Lymphatics 1989; 5: 373-90.
29. SOLERTE, S. B.; FIORAVANTI, M.; SCHIFINO, N.; PATTI, A. L.; GAMBA, G.; FERRARI, E.: *Hemorheologic and hemostatic changes in long-standing insulin-dependent (type 1) diabetic patients with peripheral and autonomic cardiovascular neuropathy*. Acta Diabetol Lat. 1988; 25: 235-42.
30. TAKAHASHI, M.; MIZUNO, K.; HAYASHI, A.; NIIMURA, S.; FUKUCHI, S.: *Increased urinary fibronectin excretion in diabetic patients with microalbuminuria*. Diabetes 1991; 40 (supl. 1): 326.
31. MUHAR, V.; GRANINGER, W.; SCHOBER, E.; SCHUSTER, E.: *Fibronectin in children with diabetes mellitus*. Arch Dis. Child. 1984; 59: 992-994.
32. CHIARELLI, F.; VERROTTI, A.; TUMINI, S.; MORGESE, G.: *Valutazione dei livelli di fibronectina plasmatica nel diabete mellito di tipo I*. Minerva Pediatr. 1988; 40: 141-3.
33. POPOVA, V. A.; OSTASHEVKAIA, M. I.; AFONIN, A. A.; BRYSKINA, A. E.: *The fibronectin levels in children with diabetes mellitus*. Probl. Endokrinol. Mosk. 1989; 35: 43-44.
34. VERGARA, M.; ALVAREZ GUIASOLA, J.; BLANCO ALFREDO; BLANCA ANA: *Estudio del factor plasmático estimulante de la prostaciclina en la infancia. Su repercusión en la patología trombótica y vascular*. Premios Ordesa 1987 a la Investigación Pediátrica. Ordesa 1988; pp. 17-47.
35. VERGARA, M.; FABRA, A.; HERMOSO F.; GUIASOLA, F. J. A.; BLANCO, A.: *Deficiencia del factor estimulante de la prostaciclina en la diabetes tipo I. Correlación con la duración e la enfermedad*. Med. Clin. 1990; 94: 490-493.

Petición de Separatas:

Prof. ALFREDO BLANCO QUIRÓS
 Cátedra de Pediatría
 Facultad de Medicina.
 C/ Ramón y Cajal, 5
 47005 VALLADOLID