

EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA*

Jesús Hernández Juárez¹, Belem Gallegos¹, Eduardo Pérez Campos Mayoral¹, Eduardo Pérez Campos¹, Socorro Pina¹ y Pedro Hernández Cruz*¹

¹Laboratorio de Glicobiología del Cáncer. Centro de Investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.
Facultad de Medicina UABJO Oaxaca México. C.P 68020 Tel y Fax: +52 (951) 513 9784
Correo E: fuegoblanco136@yahoo.com.mx

RESUMEN

Las plaquetas son componentes esenciales en la formación de coágulos en los sitios de daño vascular, pero también en la formación de trombos, en ausencia de daño vascular. Se ha sugerido que las plaquetas de los pacientes diabéticos son hiperactivas y contribuyen a la aparición de complicaciones graves de la enfermedad, como el infarto agudo de miocardio e infarto cerebral. La hiperglucemia es tan sólo uno de los factores en la diabetes mellitus, asociados a la hiperactividad de las plaquetas, no obstante, los mecanismos por los cuales induce estos efectos continúan en estudio. Esta revisión abordará los mecanismos que relacionan a la hiperglucemia con aumento en la activación plaquetaria, así como el papel que pudiera tener la glicosilación en la activación plaquetaria.

ABSTRACT

Platelets are essential components in clot formation mainly at sites of vascular damage, but also in the development of thrombi, in the absence of vascular damage. It has been suggested that platelets from diabetic patients are hyperactive and contribute to the occurrence of severe complications of the disease, such as acute myocardial infarction and stroke. Hyperglycemia is only one factor in DM associated with platelet hyperactivity, however, the mechanisms that induce these effects are not completely understood. This review will address the mechanisms that relate hyperglycemia with increased platelet activation, as well as and the role of glycosylation on the platelet activation.

INTRODUCCIÓN

En la población general, los valores de glucemia se distribuyen como una variable continua y, en consecuencia, el valor del punto de corte entre la normalidad y la diabetes es difícil de determinar y conlleva un cierto grado de arbitrariedad. De hecho, el umbral diagnóstico ha ido cambiando con los años. Idealmente, el valor de corte elegido debería identificar a individuos con alto riesgo de desarrollar complicaciones macro o microvasculares por hiperglucemia que se beneficien de un tratamiento hipoglucemiantre. Actualmente, se toman como valores de corte aquéllos en los que, en algunas

poblaciones estudiadas, aparece la complicación microvascular órgano-específica más caracterizada: la retinopatía diabética.

La hiperglucemia, término que se refiere a valores elevados de glucosa en circulación sanguínea (>100 mg/dl) y cuando sobrepasa los 240 mg/dl es un factor reconocido que ocasiona daño vascular, al inducir, la acumulación de sorbitol y fructosa a través de la vía del poliol; incremento en la formación de los productos finales de la glicación avanzada (PFGA), activación de la enzima proteína cinasa C (PKC) y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFKB) (1). Los mecanismos antes descritos tienen en co-

PALABRAS CLAVE

Glucosa,
Plaquetas;
Glicosilación.

KEY WORDS:

Glucose,
Platelets,
Glycosylation.

mún el desarrollo de estrés oxidativo. Sin embargo, información más reciente sugiere que la adición incrementada de N-acetil glucosamina (GlcNAc) a las proteínas del endotelio (2) podría afectar sus propiedades antiplaquetarias. Lo anterior, es la consecuencia de un incremento en el flujo de glucosa a través de la vía biosintética de las hexosaminas (VBH) que se origina en respuesta a la hiperglucemia. La presente revisión tiene como objetivo describir los posibles efectos de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria.

PLAQUETAS

Las plaquetas son fragmentos celulares sin núcleo, con un diámetro aproximado de 2 a 5 μm y un grosor de 0.5 μm , que se originan de la fragmentación de los megacariocitos en médula ósea. Las plaquetas poseen gránulos que contienen sustancias biológicamente activas, los más importantes son los gránulos densos, los gránulos alfa y los lisosomas. Cuando las plaquetas se activan, ya sea por adhesión a ligandos de la matriz subendotelial o por agonistas solubles, vacían su contenido a la circulación. Los gránulos densos contienen ADP/ATP, polifosfato inorgánico, pirofosfato, serotonina y calcio, y liberan su contenido por exocitosis. Los lisosomas contienen catepsinas, elastasas, fosfatases y glicosidasas que son responsables de la degradación de proteínas de la matriz celular (3). Las plaquetas tienen un papel importante en la modulación de la respuesta inmune innata debido a que poseen actividad fagocítica y antibacteriana rudimentaria (4) y en la respuesta inmune adaptativa, además de que contienen citocinas proinflamatorias como la Interleucina-1 (IL-1), de esta manera modula la respuesta inmune e inflamatoria. Las plaquetas, tienen un papel en el inicio de la inflamación, la angiogénesis, la aterosclerosis, el desarrollo y el crecimiento del tumor linfático, así mismo, contribuyen a enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (5). Participan en la hemostasia primaria formando un tapón que evita la pérdida sanguínea en los sitios de daño vascular. Para cumplir con este objetivo, las plaquetas deben activarse y agregarse entre ellas en un proceso conocido como agregación plaquetaria. La figura 1 muestra de manera simplificada la participación de las plaquetas en la hemostasia.

ACTIVACION PLAQUETARIA

Activación por receptores de adhesión

El inicio de la activación plaquetaria ocurre cuando los receptores de adhesión de las plaquetas interac-

cianan con las proteínas de la matriz extracelular en los sitios de daño vascular. La glicoproteína VI (GPVI), el complejo glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) y la integrina α IIb β 3, también conocida como glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) son las principales moléculas de adhesión de las plaquetas involucradas en su activación. Aunque las vías de señalización difieren entre estas proteínas, comparten algunas similitudes como es la activación de las cinasas de la familia Src (SFK, por sus siglas en inglés) y de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), que fosforila al fosfatidilinositol (PtdIns). La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana con actividad de tirosina cinasa, los cuales se autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforila a la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el PtdIns(4,5)bisfosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero PtdIns(3,4,5) trifosfato (PIP3), el cual, conduce al anclaje y la activación de la proteína cinasa B (PKB o Akt).

En las plaquetas se requiere a la proteína Lyn de la familia de las SFK en la activación de PI3K. PI3K actúa en conjunto con la enzima fosfolipasa C γ (PLC γ) para que ésta última conduzca a la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2) formando segundos mensajeros: inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (6,7), los cuales promueven la movilización de calcio y la activación de la proteína PKC, respectivamente.

El factor de von Willebrand (VWF), es una proteína adhesiva que se une a varios ligandos que son componentes esenciales del proceso hemostático, se une a: 1. Plaquetas y al subendotelio, a fin de fomentar la adhesión plaquetaria, 2. Plaquetas activadas, a fin de fomentar la agregación plaquetaria y 3. Al factor VIII (FVIII), para evitar la degradación prematura de este cofactor de coagulación. La interacción del factor de von Willebrand (VWF) con la GPIb activa a las plaquetas mediante un mecanismo dependiente de la activación de Akt por la vía de señalización PI3K-Akt (6,7). Se ha propuesto que Akt activa a la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) en las plaquetas y que probablemente, el óxido nítrico (NO) incremente los niveles plasmáticos del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), lo cual conlleva a la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) y de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). De manera paralela se ha sugerido un mecanismo regulado por SFK que involucra la

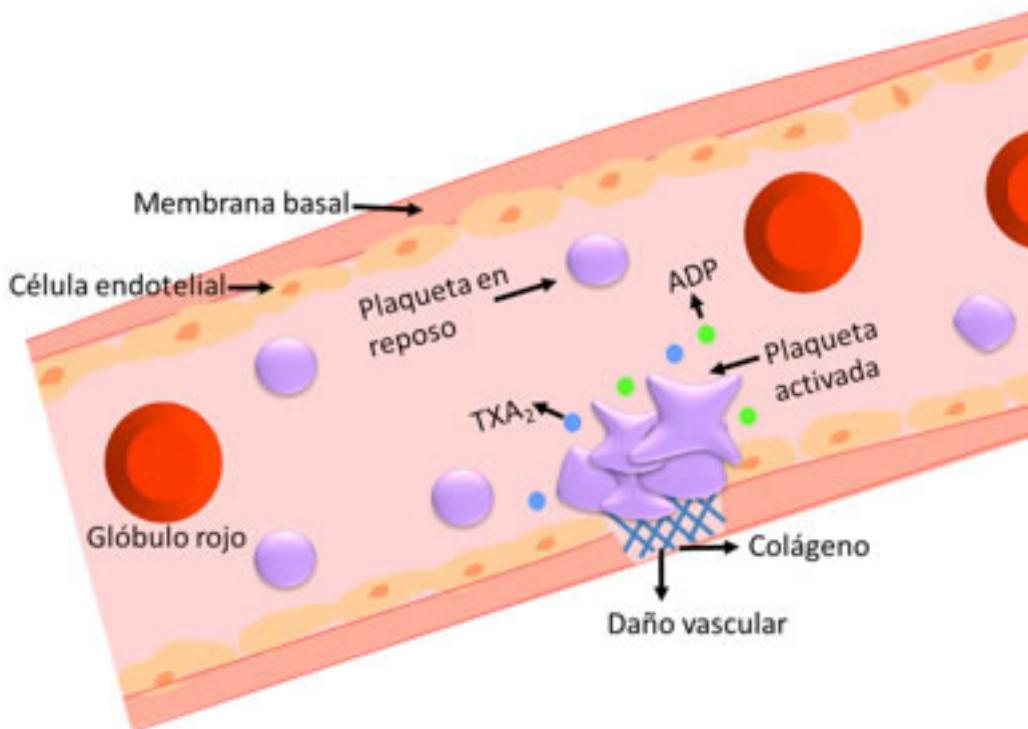


Figura 1. Funciones de la plaqueta en la hemostasia. El principal papel fisiológico de las plaquetas se cree que es en la hemostasia. Normalmente, las plaquetas circulan en la sangre en la periferia de los vasos sanguíneos, manteniéndose inhibidas por efecto del endotelio. Luego de una lesión vascular la hemostasia se activa para evitar la hemorragia. En el primer paso de este proceso, la exposición de las proteínas de la membrana basal, como el colágeno, permite que las plaquetas se adhieran al sustrato. Las plaquetas adheridas posteriormente se agregan y liberan mediadores de activación plaquetaria, tales como ADP y TXA₂, los cuales activarán a más plaquetas en el sitio de la lesión. La activación plaquetaria es crucial para la formación de fibrina en la hemostasia secundaria. TXA₂: tromboxano A2. ADP: Adenosin difosfato.

activación de la guanilil ciclase soluble (GCs) para la producción de GMPc en las plaquetas (6,7). Al parecer, la elevación moderada del NO y del GMPc tiene efectos estimulatorios en las plaquetas y no efectos inhibitorios.

Activación por los agonistas plaquetarios

Las plaquetas requieren el estímulo de distintos agonistas: trombina, serotonina y epinefrina para continuar con su activación. Además, en respuesta a algunos agonistas, el ácido araquidónico, una molécula intracelular, produce tromboxano A2 (TXA₂) que amplifica las vías de activación plaquetarias. Los agonistas plaquetarios ejercen sus efectos al interaccionar con sus receptores acoplados a proteínas G. La trombina es el agonista plaquetario más potente, se une a los receptores activados de proteasas 1 y 4 (PAR1 y PAR4) que interaccionan con las proteínas Gq y G11/13, y probablemente con la proteína Gi. Al igual que la trombina, los receptores de ADP (receptor P2Y₁₂ y P2Y₁), TXA₂ (receptor de prostaglandinas H2), serotonina (re-

ceptor HT2a) y epinefrina (receptor α2 adrenérgico) se acoplan también a sus respectivas proteínas G.

Las vías de activación difieren entre los agonistas plaquetarios, sin embargo, éstas convergen en algunos puntos de la señalización intracelular, como es la hidrólisis del PtdIns y la activación de la PI3K. La PLCβ activada (por receptores acoplados a la proteína Gq) hidroliza al PtdIns(4,5)P₂ obteniéndose IP₃ y DAG, para que posteriormente en la señalización intracelular se activen las proteínas CalDAG-GEF-1 (por sus siglas en inglés: calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor 1) y PKC, involucradas en la regulación de la secreción granular, síntesis de TXA₂ y la activación de la GPIIb/IIIa (6,7). Por su parte, el acoplamiento del receptor P2Y₁₂ del ADP a la proteína Gi es un mecanismo de activación de la PI3K en las plaquetas que, tras una serie de señales intracelulares, promueve la síntesis de TXA₂. La vía PI3K y de la PLC convergen en un punto clave de la señalización plaquetaria, y lo hacen a través de la regulación de la actividad de la proteína Rab1, un elemento esencial en la

activación de la GPIIb/IIIa, y por consiguiente, en la agregación plaquetaria.

Al igual que la activación de la GPIIb/IIIa, la secreción granular se desarrolla tras la convergencia de distintas vías de señalización celular. Entre los productos liberados de los gránulos plaquetarios (α y densos) se encuentra el agonista ADP, calcio, mediadores inflamatorios, quimiocinas, factores de crecimiento, factores procoagulantes, anticoagulantes y proteínas de la fibrinólisis. Algunas proteínas asociadas a las membranas de los gránulos plaquetario migran a la superficie celular sólo cuando las plaquetas se activan. Los gránulos plaquetarios contienen proteínas que en investigación clínica y básica se utilizan como marcadores de activación plaquetaria, en especial la proteína P-selectina.

HIPERGLUCEMIA Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La hiperglucemia es un factor desencadenante de la hiperactividad plaquetaria en la diabetes mellitus. El aumento de: calcio intracelular, volumen plaquetario medio (VPM), expresión de P-selectina, factor plaquetario 4, beta tromboglobulina, glicoproteína V, trombospondina 1, así como la síntesis de tromboxano B₂, corresponden a marcadores de activación plaquetaria en la DM (8).

El VPM aumenta con los valores de glucemia y hemoglobina glicada (HbA1c) (9), sin embargo, es importante aclarar que el VPM no se asocia de manera independiente con la glucemia ni con la DM (10).

La expresión de proteínas de membrana como P-selectina aumenta en plaquetas expuestas a concentraciones elevadas de glucosa o durante la hiperglucemia aguda, así como la expresión de glicoproteínas plaquetarias (Ib y IIb/IIIa).

El incremento de calcio intracelular es otro dato de activación plaquetaria. En este sentido, las concentraciones elevadas de glucosa incrementan la expresión los canales catiónicos de receptores de potencial transitorio 6 (TRPC6, por sus siglas en inglés) en la membrana de las plaquetas y esta respuesta es dependiente de la vía de la PI3K (14).

La hiperglucemia induce daño oxidante al promover el incremento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (15). Los pacientes con DM, sintetizan más TXA₂ en respuesta a los agonistas plaquetarios que las plaquetas de personas sin la enfermedad, probablemente debido al aumento en la actividad de la enzima ciclooxygenasa 1 (16). Durante la oxidación del ácido araquidónico por las ERO se producen intermediarios metabólicos como el isoprostanoides 8-iso-PGF₂ α , el cual está

incrementado en los pacientes con DM (17). En las plaquetas, el 8-iso- PGF₂ α incrementa la expresión de la GP IIb/IIIa, la concentración intracelular de calcio, y disminuye los efectos antiplaquetarios del óxido nítrico (NO) (18). Debido a la correlación entre la concentración de 8-iso- PGF₂ α y TXA₂, se ha propuesto al estrés oxidativo como un mecanismo de activación plaquetaria.

En 2011, Tang y cols., propusieron otro mecanismo por el cual la glucosa activa a las plaquetas (19). El estudio propone que la hiperglucemia y el colágeno actúan sinérgicamente en las plaquetas activando a la enzima aldosa reductasa dependiente de la vía del poliol, la activación de la enzima favorece la producción de ERO las cuales actúan sobre la vía de PLC_γ2/PKC/p38 α MAPK que conlleva a la activación de PLA2. Como resultado, se provee de más ácido araquidónico a la enzima COX-1, lo cual favorece la síntesis de TXA₂ y con ello, que las plaquetas sean hiperactivas.

Aunque los mecanismos de activación plaquetaria no están completamente dilucidados, se sabe que la hiperglucemia induce cambios en la bioquímica de las plaquetas. Dichos cambios se relacionan normalmente con la activación de las vías de señalización celular (12, 19, 20). En adición, estudios recientes muestran que la expresión de microRNAs (miRNAs) en las plaquetas se relaciona con activación plaquetaria (21-23). Por ejemplo, Yang y cols., en 2016 (22) observaron que la expresión de los miRNAs, miR-223 y miR-144, está alterada en pacientes con DM tipo 2 (con y sin enfermedad vascular cerebral isquémica), en comparación con donadores sanos. Se observó que la expresión de miR-223 y miR-144 en las plaquetas y en el plasma correlacionaba con la expresión del receptor P2Y12 del ADP y el sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1), así como con la glucemia y expresión de P-selectina. Además, la fosforilación de IRS-1, PI3K y Akt estaba alterada en los pacientes diabéticos. Los autores concluyen que la hiperglucemia podría activar a las plaquetas a través de miR-223 y miR-144, disminuyendo y aumentando la expresión de IRS-1 y del receptor P2Y12, respectivamente, afectando de esta manera, la vía de señalización plaquetaria de IRS-1/PI3K/Akt.

Finalmente, los cambios bioquímicos de la placa en la hiperglucemia modifican la función de las mismas. La hipersensibilidad de las plaquetas a sus agonistas (11, 12, 24), la agregación (11, 12) y secreción plaquetaria (24) incrementadas, definen en gran medida, la disfunción plaquetaria de los pacientes diabéticos.

Los efectos de la hiperglucemia en las plaquetas se resumen en la tabla 1 y figura 2.

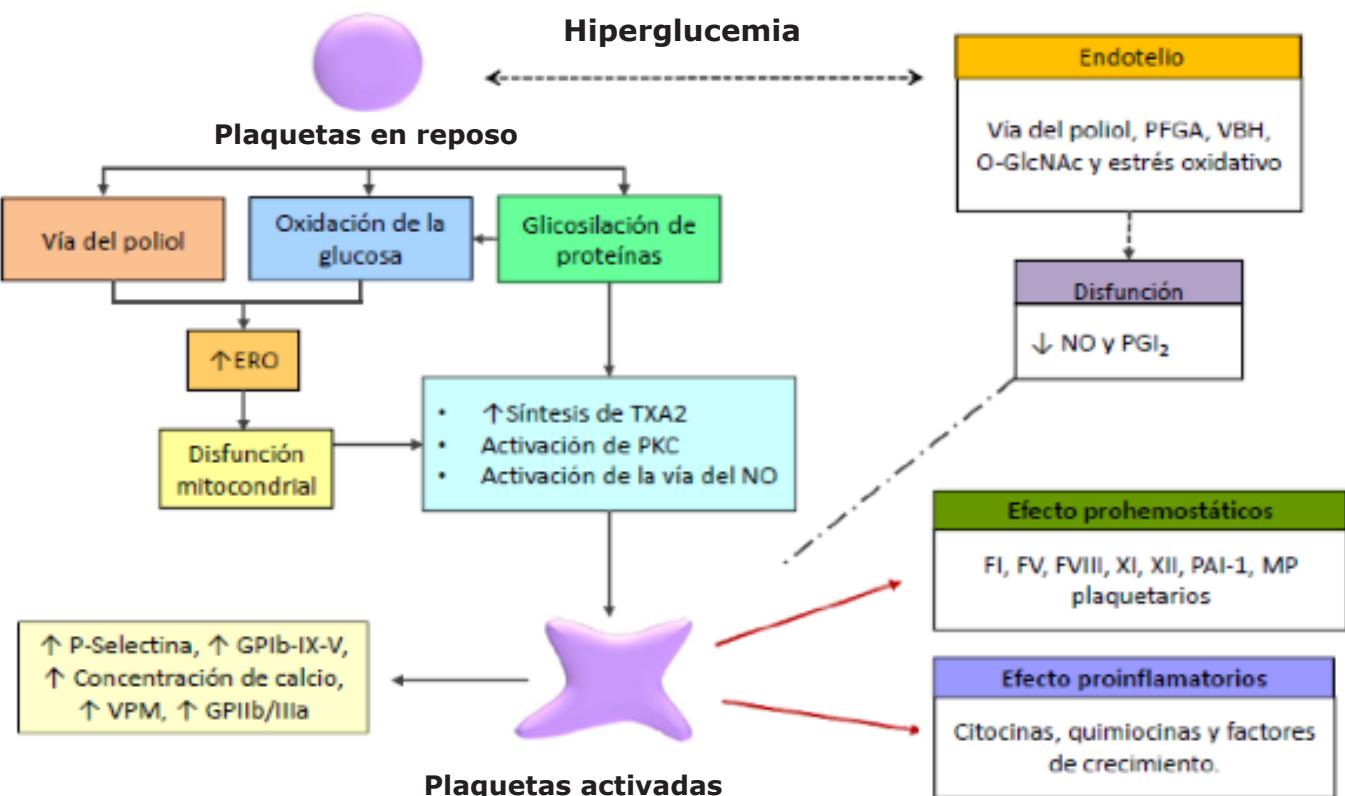


Figura 2. La hiperglucemia en la activación plaquetaria. Los mecanismos de activación plaquetaria mediados por la hiperglucemia no son claros. Sin embargo, se sugiere que el incremento de ERO y la glicosilación de proteínas inducen señales intracelulares en las plaquetas causando que estas se activen, como la activación de la vía de PKC que a su vez permite la síntesis de TXA2 y activar la vía del óxido nítrico. Como resultado, las plaquetas incrementan de tamaño, cambian su forma, secretan su contenido granular, incrementan la expresión de proteínas de membrana (P-selectina, GP Ib-IX-V, GP IIb/IIIa, entre otras) y aumentan los niveles calcio intracelular. Además, las plaquetas activadas liberan MP plaquetarias. En conjunto, estos cambios conducen a que las plaquetas se agreguen unas con otras, pero además, las plaquetas activadas promueven la formación de fibrina y la inflamación al proporcionar factores procoagulantes y mediadores inflamatorios. Debido a que el endotelio tiene propiedades antiplaquetarias, la disfunción de estas células, causada por la hiperglucemia, activa indirectamente a las plaquetas. El estrés oxidativo y la glicosilación (enzimática y no enzimática) de proteínas del endotelio son factores clave en la activación de las plaquetas. ERO: Especies reactivas del oxígeno; MP: Micropartículas; NO: Óxido nítrico; PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1; PFGA: Productos finales de la glicación avanzada; PGI₂: Prostaciclina; PKC: Proteína cinasa C; TXA2: Tromboxano A2; VBH: Vía biosintética de las hexosaminas; VPM: Volumen plaquetario medio.

Tabla 1. Alteraciones bioquímicas y funcionales de las plaquetas en la hiperglucemia.

Alteraciones bioquímicas	Referencia
Activación de vías de señalización celular	12,19,20
Síntesis incrementada de TXA2	13
Movilización de Ca ²⁺	14
Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	12,15,19
Disminución de miRNA	21,22,23
Alteraciones funcionales	
Aumento del volumen plaquetario medio	9,10
Sensibilidad incrementada a los agonistas plaquetarios	11,12,24
Activación de la GPIIb/IIIa	11,12
Expresión incrementada de proteínas de membrana	11,12,13
Incremento de la secreción granular	24

GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa; TXA2: tromboxano A2

Glicosilación no enzimática y glicosilación enzimática en la activación plaquetaria

La activación plaquetaria en la hiperglucemia requiere de mecanismos alternos como pudiera ser la glicosilación de proteínas. La glicosilación ocurre normalmente en las células, pero su incremento puede causar alteraciones en el funcionamiento de las mismas. La glicosilación no enzimática (GNE, o simplemente glicación) consiste en el ataque directo de la glucosa a las proteínas en un proceso que depende de la concentración de glucosa del medio y de la vida media de las proteínas. La GNE ocurre principalmente en proteínas de vida media prolongada. En las primeras horas de la GNE, se produce una base de Schiff la cual se origina de la unión del grupo amino de la lisina con el carbonilo de la glucosa. Transcurridos unos días, la base de Schiff se convierte en un producto más estable, conocido como producto de Amadori. Si la hiperglucemia persiste durante semanas, se producen los productos finales de glicación avanzada (PFGA o AGE, por sus siglas en inglés). Los PFGA se forman en reacciones oxidativas y no oxidativas. Además de los PFGA unidos a proteínas, también se forman productos dicarbonílicos y especies de oxígeno reactivas (ERO). Los productos dicarbonílicos pueden provenir de la oxidación de monosacáridos en solución y después formar enlaces entrecruzados con proteínas en un proceso llamado glicación autooxidativa. Las plaquetas poseen receptores para PFGA, y que éstas se activan al ser estimuladas con estos productos. Sin embargo, aunque las plaquetas sufren GNE, es poco probable que en ellas se forman PFGA debido a que viven poco tiempo en el organismo.

La glicosilación enzimática comprende a la N y O-glicosilación, la primera consiste en la unión de carbohidratos al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina, mientras que en la O-glicosilación los carbohidratos se unen al grupo hidroxilo de la cadena lateral de los aminoácidos serina o treonina. El estudio de Wang y cols., en 2012 (25), muestra la importancia de la O-glicosilación en la función de las plaquetas. Se demostró que este proceso es fundamental para la función adecuada de las proteínas implicadas en la adhesión (GPIb-IX-V) y agregación plaquetaria (GPIIb/IIIa), además, se desconoce si la O-Glicosilación pudiera contribuir a la hiperactividad plaquetaria.

Efectos de la O-GlcNAcilación en las plaquetas

Durante la hiperglucemia la concentración de glucosa se pueden incrementar en las plaquetas, existe la posibilidad de que la glucosa ingrese a la

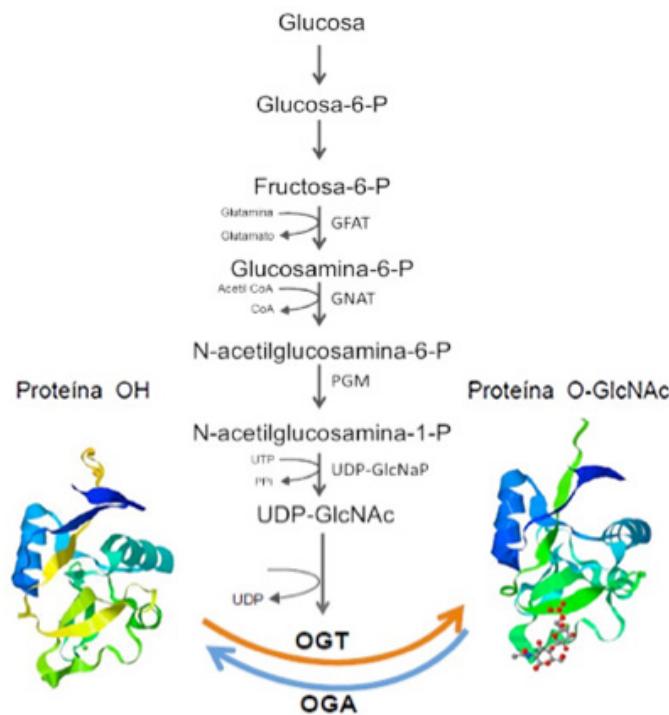


Figura 3. Vía biosintética de las hexosaminas y O-GlcNAcilación. Del 2 al 3% de la glucosa que ingresa a las células se dirige a la VBH para producir UDP-GlcNAc, sustrato de la enzima OGT. La glucosa ingresa como fructosa-6-fosfato a la VBH, posteriormente la enzima GFAT cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato, la cual es convertida a N-acetilglucosamina-6-fosfato y una reacción más tarde a N-acetilglucosamina-1-fosfato por acción de las enzimas GNAT y PGM, respectivamente. En una reacción final, la enzima UDP-GlcNAcP cataliza la formación de UDP-GlcNAc a partir de UTP y N-acetilglucosamina-1-fosfato. La enzima OGT adiciona GlcNAc a las proteínas en una reacción que tiene lugar en grupos hidroxilo de residuos de serina o treonina. La O-GlcNAcilación es un fenómeno reversible, la enzima OGA retira la GlcNAc de las proteínas, regulando de esta manera la actividad de la enzima OGT. GFAT: Glucosamina: fructosa-6-fosfato aminotransferasa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GNAT: Glucosamina-6-fosfato N-acetyltransferasa; OGA: O-GlcNAc hidrolasa; O-GlcNAc: O-GlcNAcilación; OGT: O-GlcNAc transferasa; PGM: Fosfoacetilglucosamina mutasa; UDP-GlcNAc: Uridin difosfato N-acetilglucosamina; UDP-GlcNAcP: UDP-N-Acetilglucosamina pirofosforilasa; VBH: Vía biosintética de las hexosaminas.

vía biosintética de las hexosaminas (VBH), aumentando la O-GlcNAcilación (O-GlcNAc) de proteínas.

La vía de las hexosaminas, inicia con la incorporación de glutamina por la enzima glutamina fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT), la cual cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y la glutamina. A partir de este punto se desencadena una serie de reaccio-

nes enzimáticas que culminan con la formación de uridin difosfato N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), sustrato de la enzima O-GlcNAc transferasa (OGT) (26) (Fig. 3). La O-GlcNAc de proteínas es una modificación postraduccional, análoga a la fosforilación, la cual regula la localización, estabilidad y actividad de muchas proteínas. Consiste en la adición de unidades de GlcNAc a grupos hidroxilo en residuos de serina y treonina de proteínas localizadas en el citoplasma, núcleo y mitocondria. La adición de unidades de GlcNAc a las proteínas es catalizada por la enzima OGT y es removida por la enzima O-GlcNAcas (OGA) (26) (Fig. 3).

La O-GlcNAc regula las concentraciones de glucosa en la sangre al modificar proteínas que regulan la expresión del gen de la insulina, como el factor de transcripción PDX-1 (27). Alejandro y cols., en 2015 (28) demostraron en ratones knockout para OGT, que la O-GlcNAc es un proceso que regula la función y supervivencia de las células β pancreáticas.

En relación a lo anterior, la modificación del receptor de insulina (IR), y de IRS-1 y 2 por la O-GlcNAc afecta la vía de supervivencia celular de PI3K/Akt en las células beta pancreáticas, haciendo más susceptibles a estas células a la apoptosis (29).

Las células endoteliales (CE) son células altamente especializadas, capaces de adaptar su estado funcional a estímulos diversos, por lo que el endotelio ejerce diversas funciones ateroprotectoras: regula la coagulación, la trombosis y el sistema fibrinolítico, modula la actividad de las células musculares de la capa media (tono vascular/proliferación) y controla el tránsito de macromoléculas y células inflamatorias a la pared. Cuando estas funciones son perturbadas (disfunción endotelial) se favorece el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, por otro lado, las células endoteliales se encuentran continuamente reconociendo y respondiendo en forma activa frente a los cambios que ocurren en el ambiente extracelular local, como sucede en presencia de bacteremia, trauma, isquemia-reperfusión, etc. En otras palabras, la activación de la célula endotelial se produce como respuesta adaptativa normal y la forma de presentación y duración de ésta dependerá del tipo de estímulo.

La O-GlcNAc disminuye la síntesis de NO (30), lo que sugiere que las células endoteliales están activadas o son disfuncionales. Federici y cols., en 2002 (31) hicieron evidente que la hiperglucemia y la activación de la VBH afectan la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por Akt. Se demostró que el IRS-1 es altamente modificado por la O-GlcNAc, teniendo como resultado la disminución de la fosforilación y de la

activación de las proteínas de la vía de la insulina (IR/IRS/PI3K/Akt/eNOS).

En la actualidad, no se cuenta con información contundente que demuestre cuál es el papel fisiológico o patológico de la O-GlcNAc en las plaquetas. La información se limita a un solo estudio realizado en plaquetas de ratón provenientes de dos modelos experimentales de DM (tipo 1 y 2) (32). Los resultados revelaron de manera general que en las plaquetas de los ratones hay proteínas modificadas por la O-GlcNAc y que las enzimas OGT y OGA se encuentran expresadas en las plaquetas. Aunado a estos resultados, se demostró que la expresión de la O-GlcNAc, es muy similar en las plaquetas de los ratones control y las plaquetas de los ratones diabéticos. Ferreira y cols., en 2004 (33) demostraron que la insulina atenúa la función plaquetaria al interferir con la supresión del AMPc mediante la interacción del IRS-1 con la proteína Gi. El AMPc es un inhibidor fisiológico de las plaquetas que se forma por acción de la enzima adenil ciclase (AC). Ésta última es inhibida por la proteína Gi acoplada al receptor P2Y12 del ADP. Ferreira y cols., (33) demostraron que la insulina promueve la fosforilación y asociación del IRS-1 con la proteína Gi, teniendo como resultado la disminución de la actividad de ésta última enzima, efecto que se tradujo en una reducción de los niveles intracelulares de AMPc y una respuesta débil de la movilización de calcio por efecto de los agonistas plaquetarios, ADP y trombina. Considerando este mecanismo, surge la hipótesis de que si en las plaquetas de pacientes con DM-2, la modificación del IRS-1 por la O-GlcNAc induce resistencia a los efectos inhibitorios de la insulina (Fig. 4).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las plaquetas no tienen receptores para glucosa, la activación de las plaquetas en los pacientes con DM-2 debe estar sujeta a otros mecanismos. La glicosilación de proteínas induce cambios en la estructura y función de las proteínas, de tal manera que, en las plaquetas, este evento bioquímico suscitado en las membranas de las plaquetas, y quizás, en proteínas citoplasmáticas o de los gránulos, pudiera inducir activación plaquetaria. Debido a que la O-GlcNAc afecta las vías de señalización celular, es probable que este evento contribuya a la activación plaquetaria. No podemos descartar que los efectos de la O-GlcNAc de proteínas en las plaquetas ocurran a nivel del megacariocito en la médula ósea, predisponiendo probablemente a que las plaquetas que deriven de él sean hiperactivas, o en el contexto contrario, que la O-GlcNAc sea inocua en las plaquetas.

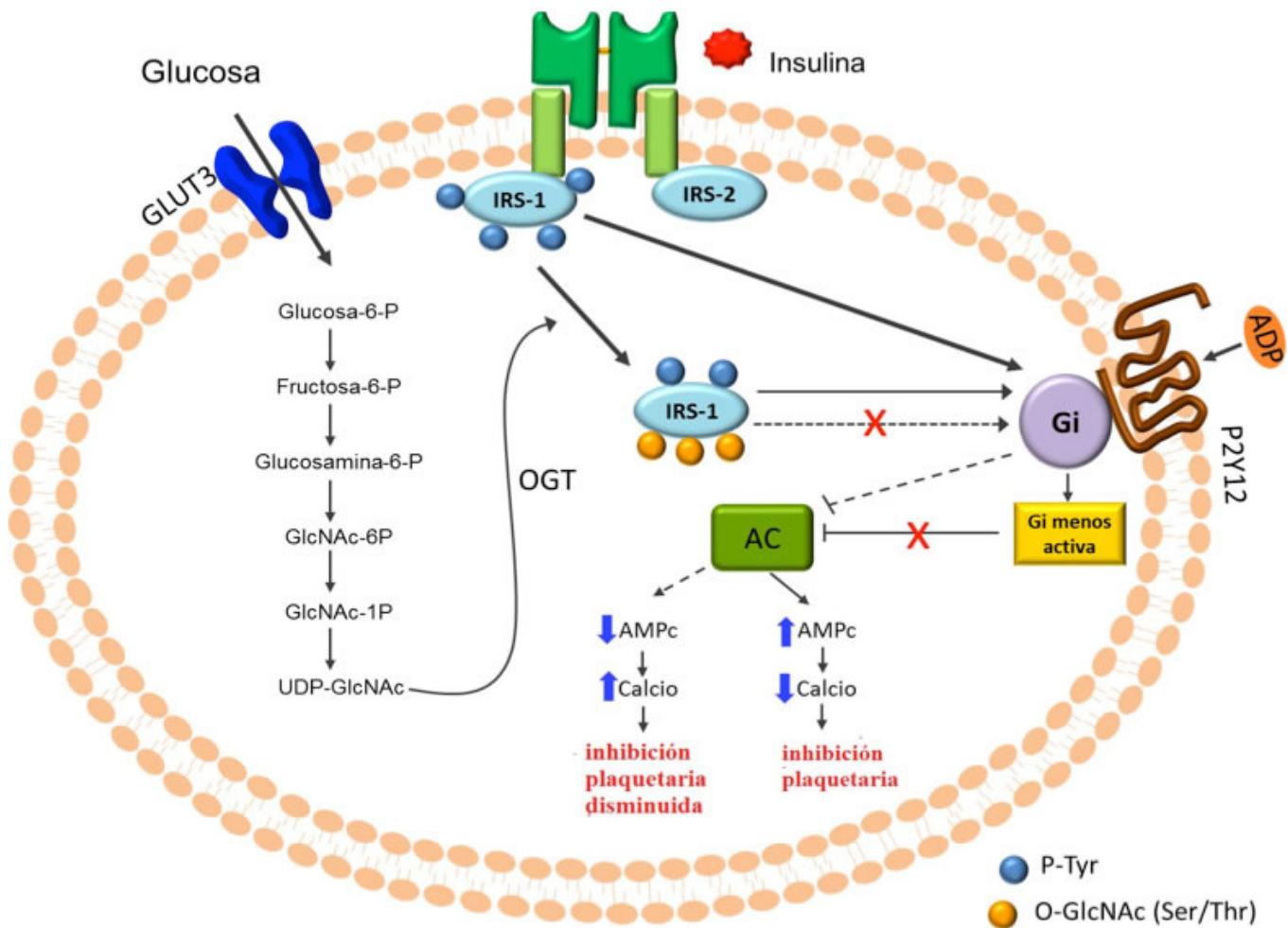


Figura 4. Mecanismo hipotético de los efectos de la O-GlcNAcilación en la plaqueta. Gi es una proteína que se acopla a receptores como el de ADP, (receptor P2Y12) suprimiendo la formación de AMPc, un inhibidor fisiológico de las plaquetas. Por lo tanto, el ADP activa a las plaquetas. La interacción de la insulina con su receptor desencadena reacciones intracelulares incluyendo la fosforilación del IRS-1 en residuos de tirosina. Gi disminuye su actividad al interactuar con IRS-1 afectando su efecto inhibitorio sobre la enzima AC, la cual cataliza la producción de AMPc e indirectamente, regula los niveles de calcio intracelular. En condiciones hipotéticas de hiperglucemia, el ingreso elevado de glucosa a las plaquetas podría estimular el proceso de O-GlcNAcilación. Probablemente, la adición de GlcNAc a IRS-1 por acción de la OGT interfiera con su fosforilación en residuos de tirosina, afectando de esta manera su interacción con Gi. En consecuencia, Gi inhibiría a la enzima AC con la concomitante supresión de los niveles de AMPc y sus efectos inhibitorios sobre las plaquetas. AC: Adenil ciclase; ADP: Adenosin difosfato; AMPc: Adenosin difosfato cíclico; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gi: Proteína Gi; GLUT3: Transportador de glucosa 3; IRS-1: Sustrato del receptor de insulina tipo 1; IRS-2: Sustrato del receptor de insulina tipo 2; O-GlcNAc: O-GlcNAcilación; OGT: O-GlcNAc transferasa; pTyr: Fosforilación de residuos de tirosina; UDP: Uridin difosfato.

El conocimiento de nuevos mecanismos moleculares en la activación plaquetaria permitirá diseñar mejores fármacos para el tratamiento de los pacientes diabéticos que sufren complicaciones relacionadas con las plaquetas. En el

caso de la O-GlcNAc, más que pensar en el desarrollo de nuevos fármacos, su relación directa con la hiperglucemia exhorta a que el control de la glucemia en los pacientes diabéticos sea más estricto.

REFERENCIAS

1. Santilli F, Simeone P, Liani R, Davi G (2015) Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 120:28-39.
2. Makino A, Dai A, Han Y, Youssef KD, Wang W, Donthamsetty R, Scott BT, Wang H, Dillmann WH (2015) O-GlcNAcase overexpression reverses coronary endothelial cell dysfunction in type 1 diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 309:C593-9.
3. Blair P, Flaumenhaft R (2009) Platelet alpha granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23:177-89.
4. Semple W, Italiano JE, Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11:264-74.
5. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 7:1759-66.
6. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2341-9.
7. Estevez B, Du X (2017) New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. *Physiology (Bethesda)* 32:162-177.
8. Kubisz P, Stanciakova L, Stasko J, Galajda P, Mokan M (2015) Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2. *World J Diabetes* 6:423-31.
9. Lippi G, Salvagno GL, Nouvenne A, Meschi T, Borghi L, Targher G (2015) The mean platelet volume is significantly associated with higher glycated hemoglobin in a large population of unselected outpatients. *Prim Care Diabetes* 9:226-30.
10. Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L, Cassetti E, Nardin M, Bellomo G, Marino P, Sinigaglia F, De Luca G; Novara Artherosclerosis Study (NAS) group (2014) Diabetes, glucose control and mean platelet volume: a single-centre cohort study. *Diabetes Res Clin Pract* 104:288-94.
11. Keating FK, Sobel BE, Schneider DJ (2003) Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 92:1362-5.
12. Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjemdahl P, Li N (2006) High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Br J Haematol* 133:315-22.
13. Gresele P, Guglielmini G, De Angelis M, Ciferri S, Ciofetta M, Falcinelli E, Lalli C, Ciabattoni G, Davi G, Bolli GB (2003) Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patient with type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 41:1013-20.
14. Liu D, Maier A, Scholze A, Rauch U, Boltzen U, Zhao Z, Zhu Z, Tepel M (2008) High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:746-51.
15. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M (2001) Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50:1491-4.
16. Siewiera K, Kassassir H, Talar M, Wieteska L, Watala C (2016) Long-term untreated streptozotocin-diabetes leads to increased expression and elevated activity of prostaglandin H2 synthase in blood platelets. *Platelets* 27:203-11.
17. Carnevale R, Iuliano L, Nocella C, Bartimoccia S, Trape S, Russo R, Gentile MC, Cangemi R, Loffredo L, Pignatelli P, Violi F; IPINET Group (2013) Relationship between platelet and urinary 8-Iso-PGF2a levels in subjects with different degrees of NOX2 regulation. *J Am Heart Assoc* 2:e000198.
18. Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, Zuliani V, Lechi A, Lechi C (1998) The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2a increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1248-56.
19. Tang WH, Stitham J, Gleim S, Di Febbo C, Porreca E, Fava C, Tacconelli S, Capone M, Evangelista V, Levantesi G, Wen L, Martin K, Minuz P, Rade J, Patrignani P, Hwa J (2011) Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest* 121:4462-76.
20. Massucco P, Mattiolo L, Russo I, Traversa M, Doronzo G, Anfossi G, Trovati M (2005) High glucose rapidly activates the nitric oxide/cyclic nucleotide pathway in human platelets via an osmotic mechanism. *Thromb Haemost* 93:517-26.

21. Duan X, Zhan Q, Song B, Zeng S, Zhou J, Long Y (2014) Detection of platelet microRNA expression in patients with diabetes mellitus with or without ischemic stroke. *J Diabetes Complications* 28:705-10.
22. Yang S, Zhao J, Chen Y, Lei M (2016) Biomarkers associated with ischemic stroke in diabetes mellitus patients. *Cardiovasc Toxicol* 16:213-22.
23. Fejes Z, Póliska S, Czimmerer Z, Káplár M, Penyige A, Gál Szabó G, Beke Debreceni I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr (2017) Hyperglycaemia suppresses micro RNA expression in platelets to increases P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 117:529-42.
24. Undas A, Wiek I, Stepien E, Zmudka K, Tracz W (2008) Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care* 31:1590-5.
25. Wang Y, Jobe SM, Ding X, Choo H, Archer DR, Mi R, Ju T, Cummings RD (2012) Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:16143-8.
26. Bond MR, Hanover JA (2015) A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* 208:869-80.
27. Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, Poitout V (2012) Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:2376-81.
28. Alejandro EU, Bozadjieva N, Kumusoglu D, Abdulhamid S, Levine H, Haataja L, Vadrevu S, Satin LS, Arvan P, Bernal-Mizrachi E (2015) Disruption of O-linked N-acetylglucosamine signaling induces ER stress and β cell failure. *Cell Rep* 13:2527-38.
29. D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G (2004) Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J* 18:959-61.
30. Beleznai T, Bagi Z (2012) Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vasc Pharmacol* 56: 115-21.
31. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106:466-72.
32. Crawford GL, Hart GW, Whiteheart SW (2008) Murine platelets are not regulated by O-linked beta-N-acetylglucosamine. *Arch Biochem Biophys* 474:220-4.
33. Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW (2004) IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem* 279:3254-64.