

# PRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PLAQUETAS\*

Sandra Hernández-García<sup>1</sup>, Facundo C. Meneses Melo<sup>2</sup> y José-Víctor Calderón-Salinas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México.\*\*

<sup>2</sup>Banco de Sangre, Hospital General Ticomán, Ciudad de México.

\*\*Autor de correspondencia correo E: shernandezg@cinvestav.mx

## RESUMEN

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas que participan en la hemostasia vascular, en la inflamación y la defensa contra patógenos. Cuentan con complejas cascadas de señalización que se activan por receptores membranales que reconocen diferentes moléculas, y que pueden ser reguladas a nivel intracelular por especies reactivas de oxígeno. Esta revisión presenta información acerca de la producción de especies reactivas de oxígeno intraplaquetarias, su papel en la activación plaquetaria y en estados pro-trombóticos, y las enzimas antioxidantes que modulan su biodisponibilidad.

## ABSTRACT

The platelets are anucleated blood cells, participate in vascular hemostasis, inflammation and the defense against pathogens; have complex signaling intracellular cascades that can be activated by physiological molecules from the membrane localized receptors. Intracellular signaling can also be regulated by reactive oxygen species production. This review summarizes information about the intraplaquetary reactive oxygen species production, its role in platelet activation and in pro-thrombotic states and the antioxidant enzymes that modulate their bioavailability.

## INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son células involucradas en funciones fisiológicas como la hemostasia y la inflamación. Como todos los tipos celulares del organismo, producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Es común asociar a las ROS con los procesos de defensa contra patógenos, la agresión y el daño oxidativo; sin embargo, para el caso de las plaquetas, la producción de ROS es un mecanismo esencial para que los procesos fisiológicos en los que están implicadas se lleven a cabo de manera exitosa; externamente regulan la biodisponibilidad de moléculas inhibitoras de la agregación y a nivel intracelular constituyen segundos mensajeros que median procesos de señalización (1-3).

Las plaquetas producen ROS cuando están en reposo y también cuando se exponen a moléculas activadoras (agonistas) como colágena, trombina,

o ADP. Es en el proceso de activación en donde las ROS endógenas tienen mayor relevancia, ya que participan como mediadoras en el proceso de de-granulación, durante el que se liberan moléculas al medio para amplificar la señal de agregación, asegurar una correcta formación del trombo y así evitar el sangrado por ruptura de un vaso sanguíneo; sin embargo, si el crecimiento y estabilización de los trombos no se regulan de manera adecuada, pueden generarse obstrucciones al flujo sanguíneo, lo que deriva en un estado conocido como trombosis.

Para evitar un desbalance en los procesos en los que las ROS participan, en las plaquetas se expresa una gama de enzimas con actividad antioxidante, que funcionan a nivel de membrana y citoplasma.

Cuando el sistema antioxidante plaquetario se desequilibra por una excesiva producción de ROS, las células se vuelven hiperreactivas, generando estados con tendencia a generar trombosis, por ello,

## PALABRAS

### CLAVE:

Plaquetas, Activación plaquetaria, ROS, Superóxido, Antioxidantes.

### KEY WORDS:

Platelets, Platelet activation, ROS, Superoxide, Antioxidants.

la modulación del estado redox intraplaquetario se considera crítica para la función plaquetaria.

La presente revisión plantea un panorama general del papel de las ROS y las enzimas del sistema antioxidante en los procesos que ocurren durante la activación plaquetaria, así como en estados patológicos que tienden a la trombosis.

## 2. ¿Qué son las plaquetas?

Las plaquetas son células anucleadas. Son las células circulatorias más pequeñas, tienen un diámetro de 2-4 μm y un volumen celular de 6-10 fL. Diariamente son producidas a partir de megacariocitos unas 1 x 10<sup>11</sup> plaquetas que tienen una vida media de 7-10 días y se retiran de la circulación por su apoptosis y fagocitosis en el sistema reticuloendotelial en hígado y bazo.

### 2.1. Función plaquetaria

Las plaquetas están implicadas en la hemostasia, la hemorragia y la trombosis patológica; también participan en procesos como la remodelación tisular, la inflamación, la angiogénesis, el crecimiento tumoral y las metástasis. A nivel celular se activan o inactivan en respuesta a moléculas solubles, citocinas y quimiocinas; tienen receptores que al ser estimulados desencadenan complejas vías de señalización; pueden iniciar la respuesta inflamatoria; participan en la defensa contra patógenos; son capaces de sintetizar proteínas y como ya se mencionó, se eliminan por procesos apoptóticos. La variedad de funciones en las que participan se debe a su facilidad de interactuar entre ellas, con moléculas de la matriz extracelular y con otras poblaciones celulares, como los leucocitos y los eritrocitos, principalmente mediante la liberación de moléculas específicas (1, 4-7), entre las que se encuentran las ROS.

## 3. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es un elemento esencial para la vida, pues participa en procesos de oxidación enzimática y del metabolismo energético. Dentro de las células, se encuentra mayoritariamente en su estado más estable, como molécula diatómica (O<sub>2</sub>). Sin embargo, dentro de los procesos del metabolismo celular, también se generan especies reactivas de oxígeno en forma de radicales libres. Un radical libre es cualquier especie química capaz de tener existencia independiente que contiene electrones desapareados en sus orbitales (8), lo que los hace altamente electrofílicos. El oxígeno en su forma diatómica, mediante reacciones de reducción parcial

da lugar a la formación de ROS, entre las que se incluyen radicales libres y especies no radicales. Entre el 1-3% del oxígeno ingresado por un ser humano es convertido a ROS de manera fisiológica (8-9). Las ROS participan de manera regular en la respuesta celular contra agentes infecciosos y en sistemas de señalización intracelular (8, 10).

## 4. Producción de especies reactivas de oxígeno por plaquetas

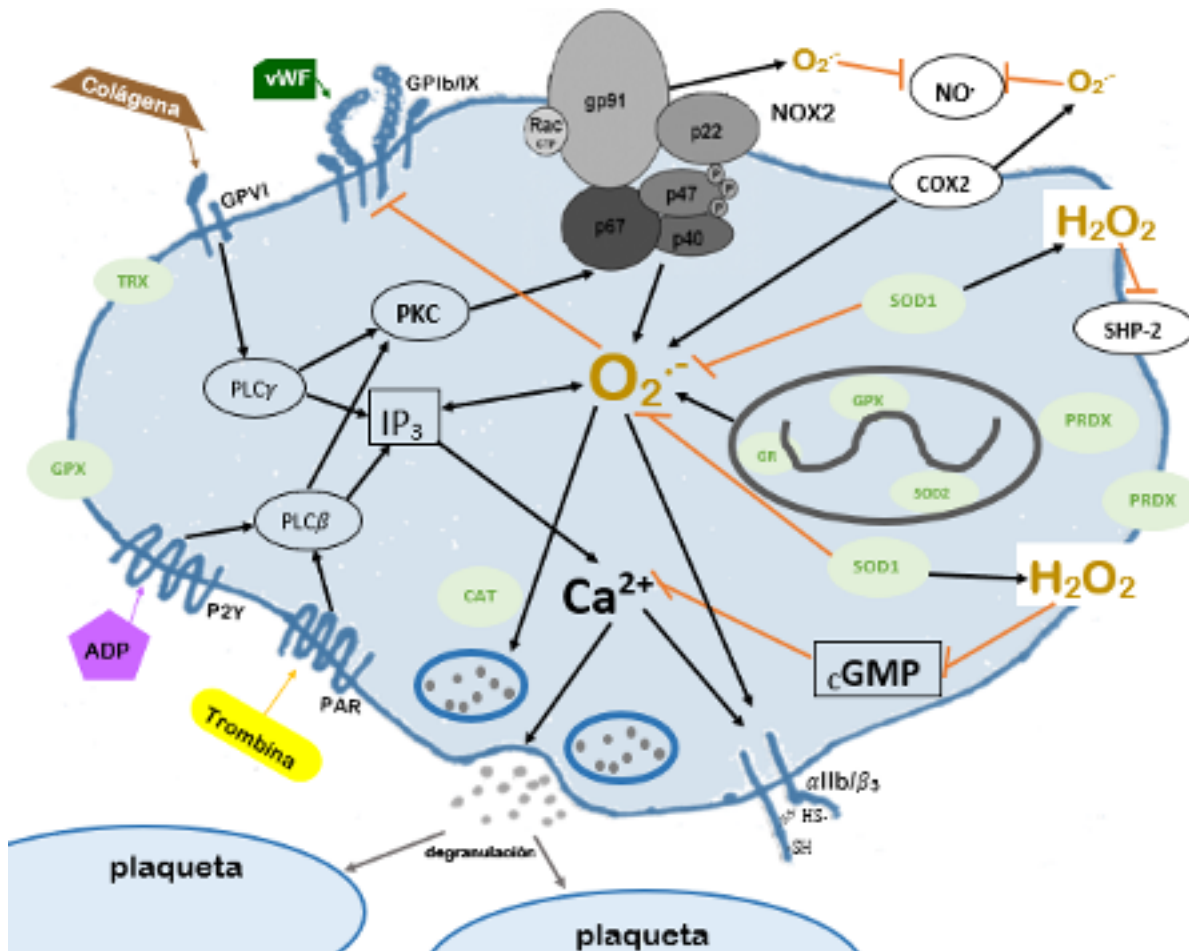
Como todos los tipos celulares del organismo, las plaquetas producen especies reactivas de oxígeno, entre las que destacan dos: el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ambas pueden favorecer la agregación plaquetaria.

Varias vías intraplaquetarias han sido señaladas como responsables de la producción de ROS: la respiración mitocondrial (cadena de transporte de electrones), la vía del ácido araquidónico (a nivel de la enzima ciclooxigenasa) (11), el sistema xantina-oxidasa (XO), el ciclo de glutatión (12), la óxido nítrico sintasa (NOS) (13) y la vía de la NOX (NADPH oxidasa), proponiéndose como la principal fuente enzimática de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en las plaquetas (14).

El complejo funcional NADPH oxidasa requiere de las proteínas de membrana (p22phox, gp91phox) y las proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox y una GTPasa Rac) (8), que necesitan ensamblarse para tener actividad enzimática.

Aunque las plaquetas producen ROS constantemente en estado de reposo, cuando se exponen a agentes activadores y los reconocen mediante receptores expresados en la membrana celular, se generan procesos de señalización que incrementan la producción de las mismas (15). Los principales agentes activadores capaces de estimular la generación de ROS son la colágena (16), la trombina y el ADP (17), los cuales desencadenan una señalización compleja a través de las vías: PI3K/AKT, PLC y PKC (18). Como resultado de la activación de las proteínas cinasas, los componentes citosólicos del complejo NADPH oxidasa se fosforilan y se traslocan a la membrana plasmática para ensamblar el complejo funcional (Fig. 1). Las plaquetas humanas expresan NOX1 y NOX2 (19), en ellas, NOX2 constituye la fuente más importante de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y ambos complejos pueden activarse también a través de Rac1 en respuesta a una despolarización de membrana (20).

Una vez activada NOX2 genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en un rango nanomolar (16), transfiriendo electrones (uno a la vez) a través de la membrana desde el NADPH al oxígeno molecular. Tras su producción, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> previene la disgregación del trombo reaccionando



**Figura 1.** Producción de especies reactivas de oxígeno y su interacción con eventos de activación en plaquetas. Los agentes agonistas (ADP, trombina y colágeno) estimulan receptores membranales que a través de la vía de la PLC/PKC promueven el ensamble y la activación de NOX2, que produce superóxido, el cual puede salir de la célula e inactivar al óxido nítrico para favorecer la agregación, o permanecer dentro y ser convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima SOD. El peróxido de hidrógeno a nivel de membrana puede inactivar fosfatasas y mediar la señalización intracelular. El superóxido y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intervienen con los eventos involucrados con la activación plaquetaria, ya sea por inactivación directa o por alteración del equilibrio del calcio intracelular. Flechas negras indican regulación positiva; líneas rojas señalan regulación negativa. SHP-2: proteína fosfatasa de tirosina con dominio SH2; PAR: receptor activado por proteasas; P2Y: quimiorreceptor purinérgico para adenosin difosfato; TRX: tiorredoxina; GPX: glutatión peroxidasa; SOD: superóxido dismutasa; PRDX: peroxirredoxina; COX: ciclooxigenasa; CAT: catalasa; vWF: factor de von Willebrand.

con el óxido nítrico (NO) producido por células endoteliales para formar peroxinitrito (21), con lo que se disminuye la biodisponibilidad de este inhibidor de la agregación.

El O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado por la NOX2 también puede ser convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o a radical hidroxilo ( $\cdot$ OH) (22) por acción de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) la cual tiene dos isoformas, SOD1 y SOD2 (23).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es más estable que el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, favorece la activación plaquetaria y la agregación mediante la disminución de las concentraciones de cGMP intraplaquetario (24). Además, es capaz de inhibir directamente a fosfatasas (SHP-2) por oxidación de

los grupos tiol de los residuos catalíticos y promover la fosforilación de residuos de tirosina de otras proteínas (25), participando así en la regulación de vías de señalización intracelular (26).

Las concentraciones de ROS en el ambiente intraplaquetario dependen tanto de los mecanismos de producción antes mencionados como de la actividad de las enzimas antioxidantes.

## 5. Enzimas antioxidantes en plaquetas

Las enzimas antioxidantes integran uno de los principales componentes del sistema de defensa celular contra el estrés oxidativo provocado por la

TABLA 1

Enzima	Isoformas	Localización	Núm. de copias/plaqueta	Reacción que cataliza	Referencia
Catalasa	CAT	Gránulos $\alpha$ , Citosol, Membrana	12,000	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	(27-30)
Superóxido dismutasa	Cu/ZnSOD (SOD1)	Citosol	13,300	$2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	(23,29,30)
	MnSOD (SOD2)	Mitocondria, Micropartículas	29,500		
Glutación peroxidasa	GPX1	Citosol, Membrana, Micropartículas	34,100	$2\text{GSH} + \text{R(OOH)COOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{R(OH)COOH}$	(26,27,29-31)
	GPX4	Citosol, Mitocondria	4,600		
	GPX7	Membrana	1,000		
Glutacion reductasa	GR	Mitocondria	5,800	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	(29)
Peroxirredoxina	PRX1	Gránulos $\alpha$ , Citosol	13,100	$\text{PRX}_{\text{red}} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{PRX}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O}$	(27,31,32)
	PRX2	Citosol, Membrana	11,100		
	PRX3	Mitocondria	31,800		
	PRX4	Micropartículas	30,900		
	PRX5	Mitocondria	20,700		
	PRX6	Membrana	7,300		
Tiorredoxina	TRX	Citosol	39,000	$\text{PRX}_{\text{ox}} + \text{TRX}_{\text{red}} \longrightarrow \text{PRX}_{\text{red}} + \text{Trx}_{\text{ox}}$	(29,33)
		Mitocondria	1,300		

Enzimas antioxidantes plaquetarias. CAT-catalasa; Cu/ZnSOD-superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc; MnSOD-superóxido dismutasa dependiente de manganeso; GPX-glutación peroxidasa; GR-glutación reductasa; PRX-peroxirredoxina; TRX-tiorredoxina.

sobreproducción de radicales libres y ROS, participan además en la regulación de la activación plaquetaria previniendo estados protombóticos. Las plaquetas expresan los mismos tipos de enzimas antioxidantes que se encuentran en células nucleadas, sus características se resumen en la Tabla 1, donde se indica su localización y las reacciones que catalizan.

## 6. Función de las especies reactivas de oxígeno en la activación plaquetaria

En el flujo sanguíneo las plaquetas circulan en estado de reposo, es decir, inactivas, por lo que no son capaces de adherirse entre sí ni a sustrato alguno. Cuando ocurre algún daño al tejido vascular, las plaquetas se activan al reconocer proteínas (factor de von Willebrand o vWF, colágena de matriz extracelular, trombina) o moléculas no proteicas (ADP,

prostaglandinas, tromboxanos), desencadenando un proceso que incluye al menos 4 eventos que pueden ser modulados por ROS (2):

### 6.1 GPIb-IX

Los receptores membranales son esenciales para que el proceso de activación plaquetaria inicie, ya que a través de ellos las plaquetas se exponen a agonistas solubles o proteínas de adherencia (Fig. 1).

Entre los receptores plaquetarios que participan en el proceso de activación, se destacan los receptores para adhesión, como el complejo GPIb-IX, que se expresa de manera exclusiva en membrana plaquetaria (alrededor de 25,000 copias/plaqueta) y está compuesto por diferentes proteínas transmembranales: GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  y GPIX (34).

En sitios con daño a tejido vascular, la GPIb $\alpha$  presente en la membrana de las plaquetas cercanas, reconoce y une al vWF activado, lo que desencadena la activación plaquetaria (35).

Las ROS pueden alterar la respuesta a agonistas desde este nivel, pues se ha observado que existe una menor expresión de GPIb $\alpha$  en membranas de plaquetas que se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que impide que se desencadene la activación plaquetaria de manera exitosa (36).

### 6.2 Degranulación y externalización de CD40L

Cada plaqueta contiene 3 tipos diferentes de gránulos: gránulos  $\alpha$ , que contienen factores de coagulación, citocinas, factores de crecimiento y receptores de adhesión; gránulos densos con ADP, ATP, serotonina, histamina, cationes divalentes, y lisosomas, gránulos que contienen diferentes proteasas (37).

Al ser activadas, las plaquetas cambian de forma y fusionan las membranas granulares con la membrana plasmática, lo que permite que se secrete el contenido de los gránulos al medio extracelular (exocitosis), un proceso conocido como degranulación (38), lo cual promueve el reclutamiento y activación de plaquetas que circulan en estado de reposo para favorecer la agregación plaquetaria y la formación del trombo (amplificación). Además de liberar rápidamente el contenido granular acumulado, las plaquetas son capaces de sintetizar mediadores adicionales que no pueden ser acumulados, como los tromboxanos y las prostaglandinas. Se ha reportado que depletar al O<sub>2</sub><sup>-</sup> intraplaquetario reduce de manera significativa el proceso de degranulación (16), lo que también sucede cuando las plaquetas son incubadas con enzimas antioxidantes y antioxidantes exógenos como N-acetil-L cisteína y ebselen, previo a la activación (15); el mismo efecto se observa cuando se activan plaquetas NOX2<sup>-/-</sup> de un modelo murino (19), pero no cuando el "knock-out" es a nivel de la enzima SOD, lo que sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no participa como mediador en el proceso de degranulación (39).

Entre las moléculas contenidas en los gránulos  $\alpha$  se encuentra anclada a la membrana granular CD40L, un ligando para receptores CD40 de leucocitos. Este ligando no se libera en plaquetas en reposo; tras la activación, se fusiona la membrana granular con la membrana plasmática plaquetaria y la cantidad de CD40L de los gránulos  $\alpha$  se presenta en la interfase externa de la membrana plasmática, en esta condición pueden actuar metaloproteasas de la matriz extracelular y liberar CD40L a la circulación (40). Las plaquetas activadas y preincubadas con vitamina C y SOD muestran una menor con-

centración de CD40L en la interfase externa de la membrana plasmática lo que sugiere que las ROS pueden participar en el proceso de externalización de CD40L(41).

### 6.3 Activación de $\alpha$ IIB $\beta$ 3

Como resultado de la activación se desencadenan redes de señalización intraplaquetaria que promueven la activación de integrinas que participan en la estabilización del trombo.

La integrina más abundante en las plaquetas es la  $\alpha$ IIB $\beta$ 3, funciona como un receptor que estabiliza la unión al fibrinógeno y a otras proteínas de adhesión de la matriz extracelular. En las plaquetas en reposo, la  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 se mantiene en un estado de baja afinidad por sus ligandos. Tras la activación, la integrina adopta una conformación extendida, con alta afinidad por sus ligandos (34, 38). Dentro de su estructura la integrina contiene dominios extracelulares ricos en tioles libres que al formar puentes disulfuro la activan, el balance entre el número de tioles libres y puentes disulfuro está regulado por la relación GSH/GSSG, la cual funciona como un potencial redox que regula la activación (Fig. 1) (15, 22). Acorde a lo anterior, la inhibición o la delección de NOX2 disminuye la expresión de P-selectinas e inhibe la activación de la integrina (17, 42-43), el mismo efecto ha sido encontrado al activar con trombina plaquetas preincubadas con enzimas antioxidantes (CAT/SOD) (15). Por otra parte, plaquetas PRXII<sup>-/-</sup> de un modelo murino presentan una mejor respuesta a la activación de  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 por colágena (25), lo que sostiene que las ROS intraplaquetarias están relacionadas también con la regulación de la activación de  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 en un proceso mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (42).

### 6.4 Ca<sup>2+</sup> intraplaquetario

Las ROS también se encuentran involucradas en la modulación de los cambios en la concentración de calcio intracelular durante el proceso de activación plaquetaria; inicialmente la producción de ROS intraplaquetarias requiere de la entrada de calcio extracelular (44). Cuando ya se han generado, las ROS median la activación de PLC y favorecen la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares (25, 45), pero no alteran su entrada a la célula (43). En respuesta a trombina, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> es la ROS que participa en la regulación de la dinámica del calcio intraplaquetario (19, 43); el calcio es esencial para los procesos de la señalización intracelular que median el cambio de forma, la adhesión, la agregación y la degranulación plaquetaria (Fig. 1) (38).



## 7. Estado redox intraplaquetario y su implicación en la trombosis

La activación plaquetaria y la formación de un trombo en respuesta a una lesión vascular son mecanismos fundamentales para mantener la hemostasia normal y limitar la aparición de eventos hemorrágicos graves, sin embargo, si se llevan a cabo en exceso o no se regulan de manera adecuada, pueden dar lugar a patologías que incluyen enfermedades cardiovasculares con tendencia a eventos trombóticos.

El mantenimiento de la hemostasia vascular está fuertemente ligado al equilibrio redox intraplaquetario. Las plaquetas tienen una participación esencial en los procesos trombóticos mediante la liberación de citocinas inflamatorias, el NO• y las ROS. El balance entre la producción de ROS, la biodisponibilidad de NO• y la actividad de enzimas antioxidantes, asegura la hemostasia vascular. Sin embargo, cuando la producción de ROS se exacerba, pueden desencadenarse eventos que lleven al organismo a condiciones protrombóticas (46-48) en las que estas especies tienen efectos tanto autocrinos como paracrinos (24), a nivel de la activación (49) y la agregación plaquetaria. El O<sub>2</sub><sup>-•</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son considerados mediadores protrombóticos (39), ya que reaccionan con el NO• formando peroxinitritos, lo que disminuye la biodisponibilidad del NO• e incrementa tanto la adhesión como la agregación plaquetaria, promoviendo estados de hiperreactividad que favorecen la formación de trombos con mayor superficie y volumen (25, 42). Este efecto podría amortiguarse por la actividad de enzimas antioxidantes como la peroxirredoxina II, la GPX1 (que cataliza la liberación de NO•), la GPX3, la SOD o la catalasa, que se consideran protectoras contra la trombosis y mediante la inactivación de ROS participan en la disminución de la sobreactivación plaquetaria, disminuyen el reclutamiento de plaquetas al trombo y favorecen una mayor biodisponibilidad de NO•, limitando con ello el crecimiento patológico de los trombos, lo que disminuye la probabilidad de eventos trombóticos en personas con enfermedades cardiovasculares (24-25, 42).

## 8. Antioxidantes y función plaquetaria: tratamiento o patología

Como se ha mencionado, existe evidencia que sostiene la importancia y la participación de las ROS en la función plaquetaria en estados patológicos (46-48, 50-51). En un intento por contrarrestar el efecto de estas especies, se ha estudiado el uso de antioxidantes sobre patologías que invo-

lucran alteraciones en la producción de ROS por plaquetas, entre los que se incluyen los siguientes antioxidantes y sus efectos:

- a) La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), disminuye la agregación plaquetaria, la degranulación y la movilización de calcio intracelular a través de la inhibición de la vía de la PKC. Además inhibe la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), incrementa la producción vascular de prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), sobrerregula la expresión de SOD y altera la fluidez de la membrana plaquetaria (52-54). Su administración conjunta con otros tocoferoles se asocia con una mayor liberación de NO, gracias a que reduce ROS (53-54). Finalmente, los tocotrienoles, que son la forma insaturada de la vitamina E, poseen efectos inhibitorios sobre la formación del trombo y la agregación plaquetaria en respuesta a la colágena o al ADP (55).
- b) La vitamina C (ácido ascórbico), reduce los niveles de O<sub>2</sub><sup>-•</sup> en plaquetas y regula la expresión de CD40L (41); a dosis altas (3 mmol/L) también disminuye la agregación plaquetaria en respuesta a la colágena o al ADP (56).
- c) El sulforafano inhibe la agregación plaquetaria en respuesta a la colágena, disminuye los niveles de activación de  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 y la expresión de P-selectinas, así como la movilización de calcio intracelular a través de la inhibición de señales intracelulares, como la vía PI3K/AKT y la de la PLC (57).
- d) El resveratrol inhibe la agregación plaquetaria *in vitro* (58).
- e) La curcumina, una sustancia fenólica de *Curcuma longa*, inhibe la activación de la vía PI3K/AKT en plaquetas (59).

No ha sido establecido el uso de antioxidantes como terapéuticos para patologías que involucren tendencias a eventos trombóticos relacionados con alteraciones de la función plaquetaria; para establecer el beneficio que puedan aportar, se requiere mayor investigación. Sin embargo, se han encontrado hasta ahora, resultados que muestran que podrían tener un papel cooperativo en la modulación de la sobreactivación plaquetaria implicada en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares.

## 9. Conclusión

Las ROS producidas por las plaquetas constituyen un grupo de importantes moduladores de la función plaquetaria, regulan a nivel intracelular la homeostasis de calcio, la degranulación y la activación de integrinas, y con ello, el proceso de activación y agregación plaquetaria. De manera secundaria, la

actividad de enzimas antioxidantes participa de este proceso al regular la biodisponibilidad de las ROS. La investigación acerca de la participación de las ROS producidas y liberadas por plaquetas en estados patológicos relacionados con tendencia a trombosis, ha abierto la posibilidad del uso de antioxidantes como herramienta terapéutica anti-

trombótica; sin embargo, aun no se establece de manera contundente la viabilidad que tienen como un tratamiento, pues hace falta explorar los efectos colaterales que el uso de antioxidantes podría tener sobre otro tipo de procesos fisiológicos relacionados o no con la función plaquetaria.



## REFERENCIAS

1. Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Front Immunol.* 2015;6(70): 1-8.
2. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129(3): 378-81.
3. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3): s11-s16.
4. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* 2012;26(2): 51-63.
5. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell.* 2007;128(6): 1173-86.
6. Michelson AD. Platelets. 3rd edition. Academic Press; 2013. ISBN 9780123878373
7. Rivadeneyra L, Ivani PC, Schattner M, Pozner RG. Así comienza la vida plaquetaria: un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2016;50(2): 233-45.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2015;5<sup>th</sup> edition. Oxford University Press; 2015. 905 p.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1): 44-84.
10. Samoylenko A, Hossain J, Mennerich D, Kellokumpu S, Hiltunen JK, Kietzmann T. Nutritional Countermeasures Targeting Reactive Oxygen Species in Cancer: From Mechanisms to Biomarkers and Clinical Evidence. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(17): 2157-96.
11. Caccese D, Praticò D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, et al. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation - Role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost.* 2000;83(3): 485-90.
12. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczyński A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 2002;13(3): 175-82.
13. Kanaya S, Ikeda H, Haramaki N, Murohara T, Imaizumi T. Intraplatelet tetrahydrobiopterin plays an important role in regulating canine coronary arterial thrombosis by modulating intraplatelet nitric oxide and superoxide generation. *Circulation.* 2001;104(20): 2478-84.
14. Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, et al. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res.* 2001;103(5): 399-409.
15. Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(2): 158-66.
16. Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002;100(3): 917-24.
17. Begonja AJ, Gambaryan S, Geirger J, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NADPH-oxidase generated ROS production regulates IIB3-integrin activation independent of the NO cGMP pathway. *Blood.* 2005; 106(8): 2757-60
18. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: A complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost.* 2016;14(5): 918-30.
19. Delaney MK, Kim K, Estevez B, Xu Z, Stojanovic-Terpo A, Shen B, et al. Differential roles of the NADPH-oxidase 1 and 2 in platelet activation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(5): 846-54.
20. Krötz F, Riexinger T, Keller M, Sohn H, Pohl U. 11,12-EETs hyperpolarize human platelets. En: Vanhoutte P, editor. EDHF 2002. London, UK: Taylor and Francis Publishing; 2003. p. 349-55.

21. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11): 1988-96.
22. Sonogo G, Abonnenc M, Tissot JD, Prudent M, Lion N. Redox proteomics and platelet activation: Understanding the redox proteome to improve platelet quality for transfusion. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2): E387.
23. Fidler T, Rowley J, Araujo C, Boudreau L, Marti A, Souvenir R, et al. Superoxide Dismutase 2 is dispensable for platelet function. *Trombos Haemost.* 2017;117(10): 1859-67.
24. Jin RC, Mahoney CE, Anderson L, Ottaviano F, Croce K, Leopold JA, et al. Glutathione peroxidase-3 deficiency promotes platelet-dependent thrombosis in vivo. *Circulation.* 2011;123(18): 1963-73.
25. Jang JY, Wang SB, Min JH, Chae YH, Baek JY, Yu DY, et al. Peroxiredoxin II is an antioxidant enzyme that negatively regulates collagen-stimulated platelet function. *J Biol Chem.* 2015;290(18): 11432-42.
26. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res Int.* 2014; Article ID761264:19 p.
27. Klockenbusch C, Walsh GM, Brown LM, Hoffman MD, Ignatchenko V, Kislinger T, et al. Global proteome analysis identifies active immunoproteasome subunits in human platelets. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(12): 3308-19.
28. Lewandrowski U, Wortelkamp S, Lohrig K, Zahedi RP, Wolters DA, Walter U, et al. Platelet membrane proteomics: A novel repository for functional research. *Blood.* 2009;114(1): 10-9.
29. Burkhart J, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012;120(15): 73-82.
30. Boyanova D, Nilla S, Birschmann I, Dandekar T, Dittrich M. PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets. *Blood.* 2012;119(3): 22-34.
31. Garcia B, Smalley D, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt D. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res.* 2005;4(5): 1516-21.
32. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet  $\alpha$ -granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost.* 2007;5(9): 1945-55.
33. Haudek VJ, Slany A, Gundacker NC, Wimmer H, Drach J, Gerner C. Proteome maps of the main human peripheral blood constituents. *J Proteome Res.* 2009;8(8): 3834-43.
34. Amelirad A, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Sarvar DP. Signaling pathways of receptors involved in platelet activation and shedding of these receptors in stored platelets. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(1): 38-47.
35. Makhoul S, Trabold K, Gambaryan S, Tenzer S, Pillitteri D, Walter U, et al. cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIIb/IIIa-mediated aggregation but not GPIIb/IIIa-stimulated Syk activation in human platelets. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1): 122.
36. Brill A, Chauhan AK, Canault M, Walsh MT, Bergmeier W, Wagner DD. Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovasc Res.* 2009; 84(1): 137-44
37. Fritsma GA. Platelet Structure and Function. *Clin Lab Sci.* 2015;28(2): 125 - 31.
38. Estevez B, Du X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. *Physiology.* 2017;32(2): 162-77.
39. Dayal S, Gu SX, Hutchins RD, Wilson KM, Wang Y, Fu X, et al. Deficiency of Superoxide Dismutase Impairs Protein C Activation and Enhances Susceptibility to Experimental Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(8): 1798-804.
40. Aoui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. The signaling role of cd40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(12): 22342-64.
41. Pignatelli P, Sanguigni V, Paola SG, Lo Coco E, Lenti L, Violi F. Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(12): 1662-6.
42. Dayal S, Wilson KM, Motto DG, Miller FJ, Chauhan AK, Lentz SR. Hydrogen Peroxide Promotes Aging-Related Platelet Hyperactivation and Thrombosis. *Circulation.* 2013; 127(12): 1308-16.
43. Kim K, Li J, Tseng A, Andrews RK, Cho J. NOX2 is critical for heterotypic neutrophil-platelet interactions during vascular inflammation. *Blood.* 2015;126(16): 1952-64.
44. Choo H, Saafir T, Mkumba L, Wagner M, Jobe S. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(12): 2946-55.



45. Harper M. Auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor, causes platelet death through calcium overload. *Platelets*. 2019; 30(1): 98-104.
46. He F, Zuo L. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11): 27770-80.
47. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia. *Geogr J*. 2004;176(3): 267-9.
48. Morel A, Rywaniak J, Bijak M, Miller E, Niwald M, Saluk J. Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients. *Mol Cell Biochem*. 2017; 430(1): 69-80.
49. Xin G, Wei Z, Ji C, Zheng H, Gu J, Ma L, et al. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* prevents thrombosis without increased bleeding risk by inhibiting platelet activation and mtDNA release. *Free Radic. Biol. Med*. 2017; 108: 247-57.
50. Sheremata WA, Jy W, Horstman LL, Ahn YS, Alexander JS, Minagar A. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2008;5: 1-6.
51. Seghieri G, Di Simplicio P, Anichini R, Alviggi L, De Bellis A, Bennardini F, et al. Platelet antioxidant enzymes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2001;309(1): 19-23.
52. Chan A, Wagner M, Kennedy C, Chen E, Lanuville O, Mezl V, et al. Vitamin E up-regulates arachidonic acid release and phospholipase A2 in megakaryocytes. *Mol Cell Biochem*. 1998;189(1-2): 153-9.
53. Liu M, Wallmon A, Olsson-Mortlock C, Wallin R, Saldeen T. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: Potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(3): 700-6.
54. Singh I, Turner AH, Sinclair AJ, Li D, Hawley JA. Effects of gamma-tocopherol supplementation on thrombotic risk factors. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16(3): 422-8.
55. Qureshi AA, Karpen CW, Qureshi N, Papasian CJ, Morrison DC, Folts JD. Tocotrienols-induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1): 58.
56. Mohammed BM, Sanford KW, Fisher BJ, Martin EJ, Contaifer Jr D, Warncke UO, et al. Impact of high dose vitamin C on platelet function. *World J Crit Care Med*. 2017;6(1): 37.
57. Gillespie S, Holloway PM, Becker F, Rauzi F, Vital SA, Taylor KA, et al. The isothiocyanate sulforaphane modulates platelet function and protects against cerebral thrombotic dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2018;175(16): 3333-46.
58. Sobotková A, Mášová-Chrastinová L, Suttner J, Štikarová J, Májek P, Reicheltová Z, et al. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. *Free Radic Biol Med*. 2009;15(1): 1707-14.
59. Xu S, Xu Z, Yan S, Le J, Chen H, Ming L, et al. Curcumin suppresses intestinal microvascular endothelial cells invasion and angiogenesis induced by activated platelets. *Exp Ther Med*. 2019;18: 1099-106.