

## HEMATOLOGIA

# RADICALES LIBRES EN EL CONTROL DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Erick Lagos Sánchez\*

**SUMMARY**

**Platelet-dependent thrombus formation may be influenced by alteration of platelet or vascular redox state, the presence of endogenous or exogenous anti-oxidants, as well as the formation of reactive oxygen and nitrogen species. In this article we intend to review which are the redox factors that participate in the process of platelet adhesion and the extent to which they participate in the normal coagulation process.**

**INTRODUCCIÓN**

La coagulación es un proceso complejo que está regulado a varios niveles (6). Las plaquetas

forman parte de esencial de este proceso y se encargan de formar un coágulo estable en medio de una malla de fibrinógeno y otras células inflamatorias, no es posible identificar el detonante de la activación plaquetaria ya que las señales provienen de múltiples vías. La adhesión plaquetaria es el proceso mediante el cual las plaquetas se adhieren al subendotelio dañado mediante la exposición durante el daño sufrido del colágeno y el factor de von Willebrand (vWF), los cuales interactúan y activan a la plaqueta a través de sus receptores específicos, el receptor de la Glicoproteína (Gp) GpIa/IIa y el

GpIb, respectivamente (6). Por otro lado la agregación plaquetaria se refiere al proceso mediante el cual las plaquetas se “unen” unas con otras, una unión que no es directa, ya que en esta interviene la formación de verdaderos “puentes” entre plaquetas a través del fibrinógeno, cuyo receptor es la GpIIb/IIIa (5). Éste receptor normalmente se encuentra escondido y sólo se expone tras el cambio conformacional que genera la activación a través de la señalización que generó, internamente, los receptores del colágeno y del vWF, así como también otros factores de la coagulación como el factor II

\* Programa del Posgrado en Biociencias de la Universidad de Costa Rica  
Sub-Investigador, Proyecto Epidemiológico Guanacaste  
Liberia, Guanacaste

activado (trombina), la producción de Tromboxano (Tx) A2 y la liberación de Adenin-difosfato (ADP) y Prostaglandina (PG) I2, entre otros factores bien conocidos (6;9).

### Rol de las especies reactivas de oxígeno en la agregación plaquetaria

Desde hace aproximadamente 10 años se ha observado que los especies reactivas de oxígeno (en adelante ROS) juegan un rol determinante en la coagulación y se había sugerido, por algunas líneas de investigación, que esta generación de ROS estaba mediada por la activación de la vía de la Fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K) (4;5;8). Otras vías que favorecen la producción de ROS son la generación de lipooxigenasas y las ciclooxygenasas, la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa y todas las citocromo p450 monooxygenasas que también generan ROS en las células endoteliales. Las Óxido Nítrico (NO) sintasas producen NO que reacciona con superóxido ( $O_2^-$ ) para producir radicales peroxinitrito (ONOO $^-$ ). Por otro lado se sabe que el NO es un potente inhibidor de la función plaquetaria (4;9;11). Esto sugiere que la generación de ROS por parte de las plaquetas no es al azar (4;9;13).

### Las NADPH oxidasas plaquetarias, la formación de radicales libres y su relación con la agregación plaquetaria: evidencia.

Anteriormente se mencionó que el mantenimiento de la agregación plaquetaria pareciera estar relacionada con la vía del PI3K y los altos niveles de Fosfatidil-inositol 3,4 difosfato (PI (3,4)P<sub>2</sub>) (10;13) y que los efectos del NO en las plaquetas son similares a lo que se observa cuando se inhibe la PI3K (10). Las plaquetas activadas producen radicales superóxido y esto aumenta la adhesión y la agregación plaquetaria (13). ¿Existe relación entre la activación de la PI3K plaquetaria y la producción de radicales superóxido con la activación de NADPH oxidasas? En su artículo original Clutton *et al.* se propusieron determinar el efecto de la inhibición de la PI3K en la producción de NO y su importancia en la función plaquetaria (3). Como primer paso los autores midieron la agregación plaquetaria tras la estimulación de TRAP (Thrombin Receptor Activating Protein) en un agregómetro con un electrodo modificado para ser capaz de detectar simultáneamente la producción de NO. Las plaquetas fueron preincubadas en los inhibidores inespecíficos de la PI3K: LY294002 y Wortmannin, sin embargo como sus efectos

son fundamentalmente idénticos se trabajó preferentemente con el primero. Los autores detectaron que tras activar las plaquetas con TRAP las plaquetas el grupo que se bañó en el inhibidor de la PI3K se agregaron normalmente, pero al cabo de algunos minutos, las plaquetas empezaron a “desagregarse” (12). La agregación inicial coincidió con un pico de liberación de NO, pero la desagregación coincidió con un segundo pico de producción de NO. Seguidamente los autores se propusieron “secuestrar” este segundo pico de NO mediante la adición de un “scavenger” conocido, la Ferrohem-Mioglobina. Con esto observaron que se abolía el segundo pico de liberación de NO, y con esto se restauraba simultáneamente la agregación normal. También se observó que el segundo pico de producción de NO está asociada con un aumento en la producción del GMPc (Guanosín monofosfato cíclico) pero sólo en las plaquetas pretratadas con el inhibidor, lo que sugiere que el GMPc intracelular favorece la desagregación plaquetaria. Con esto los autores concluyeron que la desagregación es el resultado de la liberación secundaria de NO inducida por el inhibidor de PI3K.

Dado que la producción de NO plaquetaria está mediada por la eNOS (Sintasa de óxido nítrico endotelial) plaquetaria y que

la activación de ésta enzima requiere de la regulación mediante fosforilación, se buscó evaluar el efecto que tenía la PI3K, una kinasa, en la actividad de la eNOS, sin embargo no se detectaron cambios significativos, tampoco se observó un cambio significativo en la fosforilación de la Ser1177 de la eNOS, un importante paso en la inhibición de ésta enzima (estos datos no aparecen reportados en el artículo). Se sabe que el  $O_2^-$  producido por los plaquetas agregadas reacciona con el NO rápidamente, reduciendo su actividad. En este estudio se observó que la liberación de superóxido disminuyó significativamente en las plaquetas estimuladas con el inhibidor del PI3K. Esto sugiere que la producción de este radical está mediada por la activación de la vía PI3K. Previamente se había documentado que las plaquetas expresan subunidades de las Nicotinamida adenin difosfato reducido) NADPH oxidasas no fagocíticas. La presencia de subunidades de la NADPH oxidasa (p67- y p47-phox) se demostró mediante inmunoblot (datos no se muestran en el artículo original). Se hizo un inmunoblot de la fracción de proteínas del citoesqueleto de las plaquetas tratadas con el inhibidor del PI3K. Tres minutos después hubo un aumento significativo en la p67-phox en el grupo control, lo que sugiere que la actividad NADPH oxidasa está

disminuida como consecuencia del inhibidor del PI3K. Para comprobar estos hallazgos *in vivo*, se diseño un modelo de ratón deficiente en NOS-III, el análogo humano del eNOS. Las plaquetas de los ratones deficientes de NOS-III no liberan NO y en éste estudio se vio que no muestran desagregación en presencia del inhibidor de PI3K. Además, en comparación con las plaquetas tratadas con el inhibidor, las plaquetas incubadas con el control silvestre o NOS-III deficientes no mostraron ninguna actividad de desagregación lo que sugiere que la PI3K regula la liberación de superóxido, pero el NO se requiere para que ocurra la desagregación. (Nuevamente datos no se mostraron). Los autores concluyen que 1) el NO contribuye a la desagregación plaquetaria, 2) se considera que la PI3K contribuye esencialmente a mantener la actividad de la GpIIb/IIIa, 3) los donadores de NO también mantienen la actividad de la GpIIb/IIIa y así como también la unión a fibrinógeno, 4) la desagregación plaquetaria está precedida por un aumento en la producción de NO (3;7;12). Además comentan que la disminución significativa del superóxido plaquetario sugiere que el aumento en el NO plaquetario puede ser el resultado de una disminución en la producción de superóxido. Esto sugiere que la desagregación causada por la

inhibición de la PI3K inducida por NO se explica por la disminución en el superóxido plaquetario y que la inhibición de la PI3K contribuye a un descenso en el superóxido producido por NOX lo que en el experimento se vio como un aumento en la biodisponibilidad del NO derivado de las plaquetas (3;7).

Otras funciones de la NOX plaquetaria que se han estudiado se pueden dividir en dos: coagulación y defensa. En un estudio se observó que la expresión de superóxido aumenta la producción de ROS por parte de los neutrófilos (se desconoce si mediante liberación de TXA2) y esto favorece un estallido respiratorio más marcado (2). Por otro lado se vio que la inhibición de la NADPH oxidasa plaquetaria inhibe la generación de ROS producida por plaquetas activadas por colágeno, la agregación de plaquetas inducida por colágeno, la liberación de TXA2 inducido por colágeno, la producción de ROS inducida por trombina y la agregación plaquetaria inducida por trombina (2). Actualmente se sabe que la expresión de Gp91-phox en plaquetas es prácticamente idéntica a la expresión de ésta subunidad en Polimorfonucleares por lo que la producción de ROS se ha convertido en una parte esencial de la coagulación (2). Existen múltiples puntos de control por parte de los ROS en las plaquetas.

El sistema del glutatión reducido-oxidado o GSH o GSH/GSSG genera grupos sulfhidrilos en la subunidad beta del receptor del fibrinógeno GpIIb/IIIa lo que lo mantiene en un estado inactivo (1). El cofactor redox proteín disulfuro isomerasa y grupos sulfhidrilo en la membrana de la plaqueta mantienen el estado redox de las integrinas. Los inhibidores de la GpIIb/IIIa reducen la producción de radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> y reducen la translocación de subunidades de la NOX lo que sugiere que también modulan la generación de ROS(1). Por último se ha observado que el ejercicio extenuante de forma aguda suprime el estallido respiratorio de los neutrófilos inducido por plaquetas posiblemente al reducir la fosforilación de la PKC $\zeta$  (Proteín kinasa C tipo Zeta), la fosforilación de la p47-phox y su translocación a la membrana, lo que inhibe el ensamblaje del complejo y esto se ha tratado de relacionar con los efectos benéficos del ejercicio (5).

## CONCLUSIÓN

En conclusión, la regulación del estrés oxidativo así como también las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno juegan un papel determinante en la función plaquetaria y la trombosis y esto se traduce en la expresión clínica de eventos trombóticos.

## RESUMEN

La formación del coágulo dependiente de plaquetas, puede estar influenciada por la alteración del estado redox vascular o de las plaquetas, la presencia de antioxidantes endógenos o exógenos, así como también, la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. En esta revisión veremos cuáles son los factores redox que intervienen en la agregación plaquetaria y la extensión de su participación en el proceso de coagulación normal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chakrabarti S, Clutton P, Varghese S, Cox D, Mascelli MA, Freedman JE. Glycoprotein IIb/IIIa inhibition enhances platelet nitric oxide release. *Thromb Res* 2004; 113(3-4):225-233.
- Chlopicki S, Olszanecki R, Janiszewski M, Laurindo FR, Panz T, Miedzobrodzki J. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6(4):691-698.
- Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(1):187-192.
- De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992; 85(6):2284-2290.
- Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3):s11-s16.
- Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; 359(9):938-949.
- Gorlach A. Redox regulation of the coagulation cascade. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(9-10):1398-1404.
- Kovacsics TJ, Bachelot C, Toker A et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem* 1995; 270(19):11358-11366.
- Krotz F, Sohn HY, Gloe T et al. NAD(P) H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002; 100(3):917-924.
- Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274(20):14368-14375.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2(8567):1057-1058.
- Saeed SA, Connor JD, Imran et al. Inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on reactive oxygen species and platelet aggregation. *Pharmacol Rep* 2007; 59(2):238-243.
- Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; 13(3):175-182.