

Tapia Cadena, Mercedes

Estudios ultraestructurales y de captación de mepacrina en plaquetas humanas adicionadas con galectina-I. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012. E-Book.

ISBN 978-950-34-0817-9

1. Biología. 2. Tesis de Maestría. I. Título
CDD 574.071 1

Fecha de catalogación: 25/11/2011

1.INTRODUCCION

1.1. Galectinas

Las galectinas constituyen una familia de lectinas, con afinidad por azúcares β -galactosídicos. Existen 12 galectinas presentes en seres humanos y hoy en día abarcan, en conjunto, 15 miembros (Rabinovich GA et al., 2002, Satterfield et al., 2006), siendo designadas como Gal-1 a Gal-15 (Cooper DNW y Barondes SH, 1999; Visegrady B et al., 2001).

Previamente fueron conocidas como *lectinas de tipo S o S-Lac*. Las galectinas son una familia filogenéticamente conservada de lectinas que contienen secuencias de aminoácidos características compartidas y dominios de reconocimiento a carbohidratos (DRC) (Barondes SH et al., 1994). Todas las galectinas unen lactosa y otros oligosacáridos β -galactosídicos (Elola MT y Fink NE, 2000). Los DRC de todas las galectinas comparten afinidad por el ligando N-acetilactosamina -un disacárido común que se encuentra en muchas glicoproteínas celulares- sin embargo las galectinas individuales, también pueden reconocer modificaciones de este ligando, desarrollando múltiples especificidades (Ahmad N et al., 2004). Las galectinas se expresan en diferentes tipos celulares, en animales, en vertebrados mamíferos y no mamíferos e invertebrados, y también se encuentran en plantas. Las galectinas están presentes intracelularmente en el citosol, así como en el núcleo. La amplia distribución de galectinas con respecto a especies y tejidos sugiere que ejercen diversas funciones, las cuales se han difundido en diferentes estudios durante la década pasada (Almkvist J y Karlsson K, 2004).

A pesar de que carecen de un péptido señal, las galectinas pueden ser secretadas extracelularmente por un camino similar al utilizado por la interleuquina-1 (IL-1) y la anexina 1. La carencia de la secuencia señal secretoria indicaría que no siguen la ruta clásica R.E./aparato de Golgi, pero sin embargo, algunas galectinas se encuentran en el espacio extracelular o en la superficie celular. Esta externalización inusual, podría prevenir la asociación de la Gal-1 con glicoconjugados que se procesan en las vesículas secretorias normales (Hughes RC, 1999). A través de estudios de localización de las galectinas se sabe que estas proteínas pueden secretarse en múltiples compartimentos celulares dependiendo del estatus celular (Danguy A et al., 2002; Liu y Rabinovich G A, 2005).

De acuerdo a su estructura bioquímica se clasifican en (Fig. 1.1.; Hirabayashi J y Kasai K, 1993).

- Galectinas *proto-type*: contienen un DRC, reconocen estructuras simples de carbohidratos disacáridos. Están incluídas dentro de este grupo, las galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15. Se encuentran como monómeros (galectinas 1, 5, 7, 10) o como homodímeros (galectinas 1, 2, 11, 13, 14, 15).
- Galectinas *chimera-type*: la galectina 3 es el único miembro de esta familia, contiene un DRC y un dominio no lectina.
- Galectinas *tandem repeat-type*: contienen dos DRC estructuralmente diferentes, conectados, permitiendo que interaccionen con carbohidratos diferentes. Pertenecen a este grupo, las Galectinas 4, 6, 8, 9 y 12.

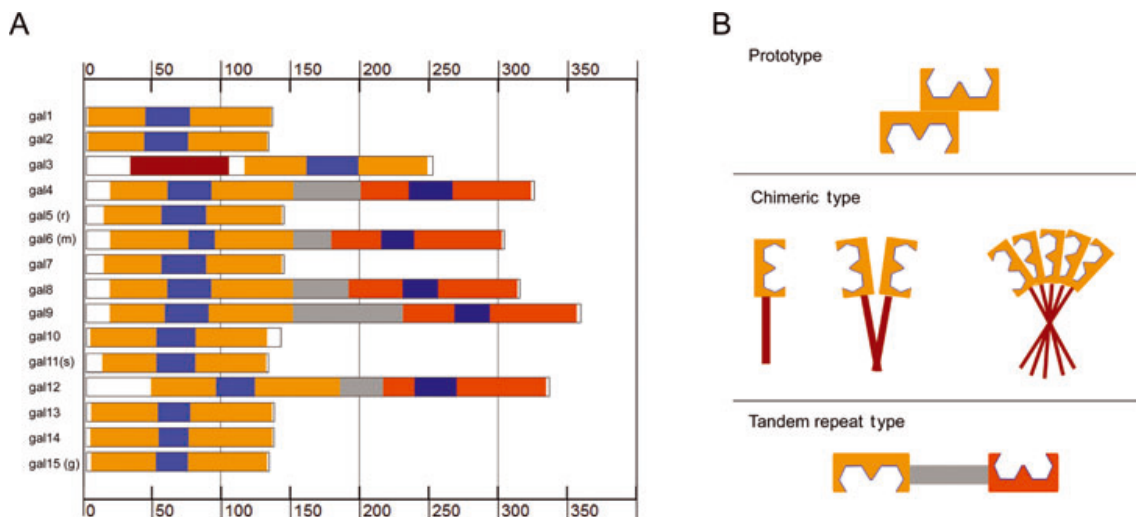


Figura 1.1: Representación esquemática de los componentes estructurales de las galectinas A) Esquemas de diferentes galectinas. Representantes de otras galectinas diferentes del humano como (rata-r, m-ratón, ovino-s, g-cabra). Su principal característica es el dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC, naranja). Se trata, dentro del DRC, de una extensión muy conservada de aminoácidos, que son esenciales para la interacción de hidratos de carbono (azul). El tamaño de cada galectina y el dominio se indica por el número de aminoácidos (0-350). B) De acuerdo a su configuración, las galectinas se subdividen en tres grupos diferentes. Los miembros de la familia prototipo (arriba), la de tipo quimérico (centro) y la del tipo de secuencias repetitivas (Tandem repeat type) (gris) (tomado de Hirabayashi J, Kasai K., 1993).

1.1.1. Galectina 1(Gal-1)

1.1.1.1. Gen

El gen que codifica a la Gal-1 fue denominado LGALS1 (*Lectina que une Lactosa Soluble*), está ubicado en la región q12 del cromosoma humano 22 (Merahrabian M. et al., 1993). Posee 4 exones y 3 intrones, los exones se empalman formando un transcripto de 0,6 kb que codifica para una proteína de 135 aminoácidos (Camby I et al., 2006). La secuencia del dominio que liga carbohidratos está principalmente codificada por tres exones y la mayoría de los residuos conservados están en el exón III (UIT MA y Barondes SH, 1991). Una pequeña región, dentro de la región promotora, el sitio (-63 /+ 45), es el responsable de poner en marcha la transcripción inicial y es suficiente para desencadenar la actividad transcripcional del gen de Gal-1 en ratones. Un sitio adicional de iniciación se ha localizado en la posición 31, así como también un sitio de unión Sp1 (-57/-48) y un iniciador consenso (Inr) (elemento que se superpone a la caja TATA) produciendo la iniciación directa del ARN. La posición aproximada de los demás elementos reguladores se indica en la Fig. 1.2., siendo la caja CAAT, el sitio de unión del factor nuclear kappa B (BF-kB) y las secuencias de respuesta a butirato de sodio y ácido retinoico. El nivel de metilación del promotor de Gal-1 es un mecanismo muy importante para controlar la expresión del gen (Chiariotti L et al., 2004).

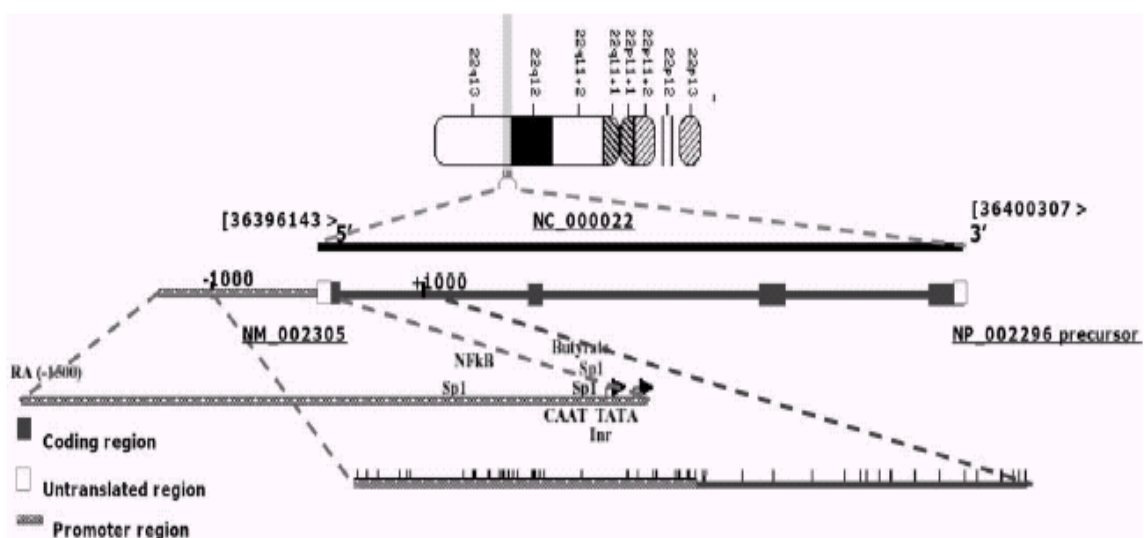


Figura. 1.2. Mapa del Gen de Gal-1 ubicado en el cromosoma 22q12 (tomado de Chiarotti et al., 2004)

1.1.1.2. Estructura y localización de la Gal-1

La Gal-1 es un homodímero soluble, cada subunidad tiene un PM de aproximado de 14,5 kDa y se unen entre si por medio de interacciones hidrofóbicas. Pertenece al grupo de galectinas *proto-type*. La estructura secundaria de la proteína consiste en un sándwich que consta de dos hojas antiparalelas β de cinco (F1-F5) y seis (S1-S6a / b) pasos. El N y C terminal de cada monómero se coloca en la interfase del dímero y los DRC están situados en los extremos terminales de la misma cara; esta configuración forma un bolsillo con cargas negativas en el interior de la cavidad (López-Lucendo MF et al., 2004). (Fig. 1.3.).

La Gal-1 se expresa en diferentes tejidos/órganos humanos, incluyendo timo (Baum L et al., 1995), colon (Hittlet et al., 2003), bazo (Ahmed et al., 1996), músculo liso (Moiseeva EP et al., 2000), ovario (Van den Brule F et al., 2003) sistema nervioso (Akazawa C et al., 2004), en la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 (Couraud et al., 1989), en pulmón (Gitt MA y Barondes SH, 1986; Hirabayashi Jet al., 1989) y línea celular de hepatoma HepG2 (Abbott WM y Feizi T, 1989; UIT MA y Barondes SH, 1991). Acorde a esta amplia distribución, Gal-1 tiene funciones biológicas pleotrópicas, promover la proliferación celular (Adams L et al., 1996; Vas V et al., 2005), adhesión (Moiseeva EP et al., 2003) migración (Moiseeva EP et al., 1999), diferenciación (Sasaki T et al., 2004), procesamiento de ARNm (Vyakarnam A et al., 1997), transformación neoplásica (Paz A et al., 2001) y apoptosis e inducción de algunas células, como timocitos inmaduros (Perillo NL et al., 1997), linfocitos T activados (Nguyen JT et al., 2001), células cancerígenas mamarias humanas (Wells V et al., 1999), y línea celular de cáncer de próstata LNCaP (Ellerhorst J et al., 1999). La expresión de Gal-1 fue evidenciada en sitios de privilegio inmune: en la malla trabecular ocular humana normal y glaucomatosa (Fautsch et al., 2003), placenta (Hirabayashi J y Kasai K , 1988; Couraud PO et al., 1989; Iglesias MM et al., 1998a), y testículo (Dettin L et al., 2003). En el testículo, estudios inmunohistoquímicos revelan la presencia de Gal-1 en células de Sertoli, peritubulares y de Leydig (Pollina U et al., 1999). En bovino, se dispone de la secuencia completa de las Gal-1 de corazón y de la línea celular de fibroblastos EBTr (Abbot W N y Feizi T, 1989) y de bazo (Liao DI et al., 1994). Otras galectinas secuenciadas son las de pulmón y útero de rata, (Clerch et al., 1988), cerebro (Hynes MA et al., 1990) y corazón de cerdo (Merkle RK et al.,

1989). Perfiles diferentes de expresión de lectinas se han demostrado en células cancerígenas, comparados con células normales (Van den Brule F et al., 2004; Liu FT y Rabinovich GA, 2005). Varios estudios han demostrado un incremento en la expresión de Gal-1 en diferentes tumores, entre ellos astrocitomas (Camby I et al., 2001), melanomas (Rubinstein N et al., 2004), y carcinomas tiroideos (Xu Z et al., 1995). Además, existe una fuerte relación entre la expresión de Gal-1 y la malignidad de gliomas (Yamaoka et al., 2000). Contrariamente, un descenso de la expresión de la lectina fue documentado en cáncer de cabeza y cuello (Choufani G et al., 1999).

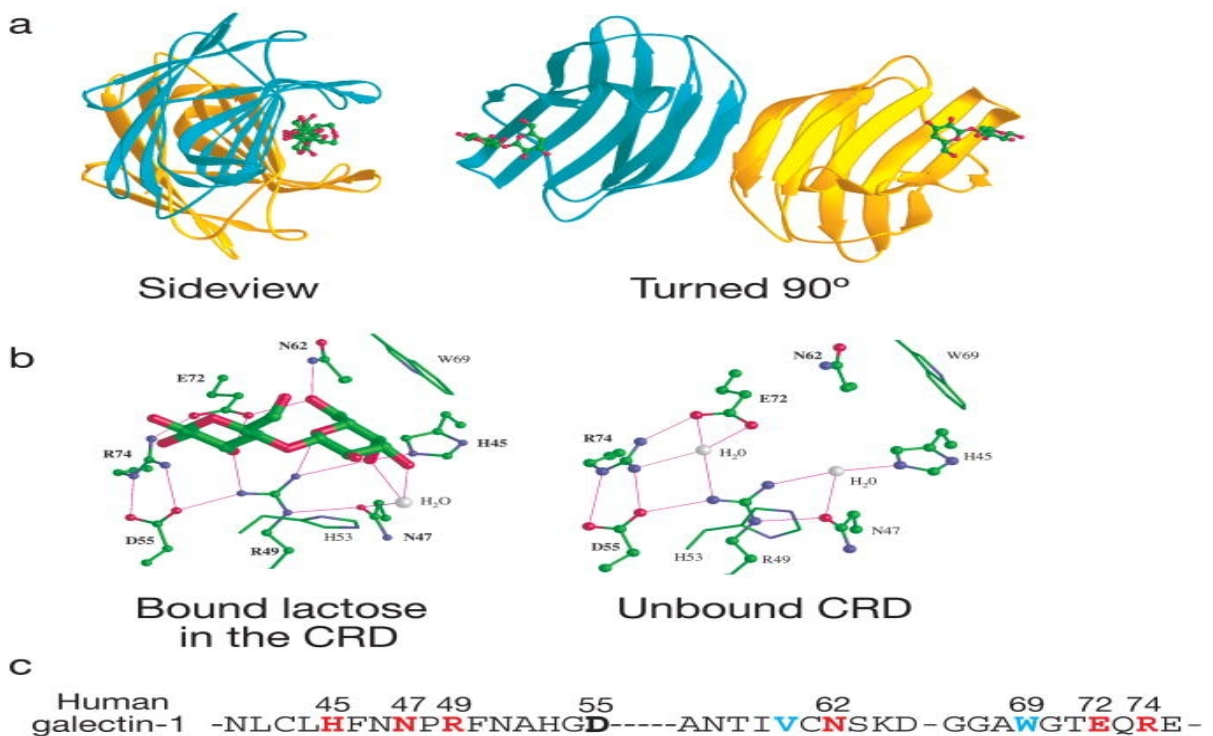


Fig. 1.3. Estructura de la Gal-1 .a) Diagrama de la estructura cristalina de la galectin-1 humana, basado en análisis cristalográficas de rayos x del complejo proteína/ lactosa. El homodímero se muestra con cada monómero de color diferente y se presentan vistas ortogonales. La interfase entre las subunidades se basa en interacciones entre los dominios de carboxilo y amino-terminal de cada subunidad. b) Interacciones entre los residuos de aminoácidos claves dentro del DRC de Gal-1 cuando la lactosa esta unida (izquierda) y cuando el azúcar no esta enlazado (derecha). c) Secuencia primaria de Gal-1 humana con los residuos numerados correspondientes a los resaltados en la estructura cristalina (arriba) (Cummings RD et al., 2009).

1.1.2. Papeles biológicos de las galectinas

Inicialmente se pensó que las galectinas sólo se unían a glicanos endógenos (“propios”) y mediaban los procesos de desarrollo incluyendo la diferenciación celular y la organización tisular y, posteriormente se incluyó, la regulación de la homeostasis inmune. (Leffler H et al., 2004; Yang R et al., 2008) (Fig.1.4.). Sin embargo, ha quedado claro que las galectinas también se unen a los glicanos de superficie de microbios potencialmente patógenos y de algunos parásitos que median las funciones de reconocimiento, efectoras de la inmunidad innata (Sato S et al., 2004). Los glicanos que contienen cadenas de polilactosamina [(Gal β 1,4GlcNAc) $_n$], tales como la laminina, la fibronectina, las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas, y las mucinas, son los ligandos endógenos preferidos de las galectinas de los mamíferos, las aves y los anfibios (Fang R et al., 1993; Seetharaman J et al., 1998;). No obstante, la función biológica de una galectina particular puede variar de un lugar a otro, dependiendo de la disponibilidad de los ligandos apropiados. Sin embargo, las propiedades de unión y las funciones biológicas de las galectinas en el ambiente extracelular oxidativo, pueden depender de su unión inmediata al ligando, lo que previene la oxidación de los residuos de cisteína libres, así como de la susceptibilidad a la proteólisis (Lobsanov YD et al., 1993; Liao DI et al., 1994). La unión de las galectinas a los glicolípidos de la superficie celular que contienen β -galactósidos y glicoproteínas, puede conducir a la formación de redes que agrupan a estos ligandos en microdominios “raft” (en balsa) de lípidos que se requieren para la transmisión óptima de señales relevantes para la función celular (Rabinovich GA et al., 2007; Partridge EA et al., 2004) (Fig.1.4.). Las galectinas en solución pueden formar especies multivalentes en un equilibrio dependiente de la concentración (Morris S et al., 2004). Las galectinas de *tipo proto* se asocian como dímeros unidos de forma no covalente a través de una interfase hidrofóbica, mientras que la galectina-3 se asocia vía su dominio N-terminal para formar oligómeros que en la presencia de oligosacáridos multivalentes en solución o en la superficie celular despliegan una cooperación para el enlace. Las galectinas bivalentes del *tipo repetición en tándem* pueden reconocer diferentes ligandos sacáridos con un polipéptido sencillo, aunque también pueden formar agregados de orden más elevado que mejoran su afinidad. El ensamblado de galectinas mediados por “rafts” de lípidos que modulan el recambio de receptores endocíticos, señala vías de transducción que conducen a la activación de células T, secreción de citocinas, apoptosis, maduración de células B,

activación y tolerancia, activación de neutrófilos que conduce a la fagocitosis, estallido oxidativo, liberación de proteasas y citocinas. Así, se ha propuesto que las redes de galectina-glicoproteína en la superficie celular funcionan como un “interruptor de encendido-apagado” que regula la proliferación celular, la diferenciación y supervivencia, incluyendo la respuesta inmune y la tolerancia (Brewer CF et al., 2002; Dam TK et al., 2008).

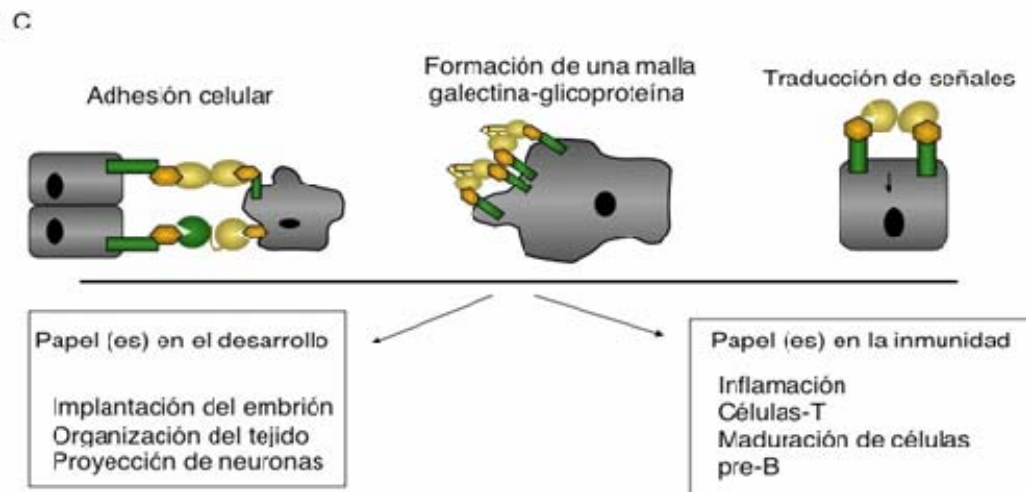


Figura. 1.4. Papel biológico de las galectinas. Tomado de Vasta GR 2010

1.1.2.1. Funciones en el desarrollo temprano

Se ha propuesto que las galectinas participan en diversas funciones biológicas relacionadas con el desarrollo y neoplasias. Esto se ha basado en su unión a las fracciones “propias” de los carbohidratos, tales como los glicanos que contienen polilactosamina y que abundan en la superficie celular y en la matriz extracelular. Se ha planteado que las galectinas de pollo participan en la fusión de mioblastos, mientras que las galectinas-1 y -3 de murinos tendrían algún papel en el desarrollo de la notocorda, en la somitogénesis, y en el desarrollo del tejido muscular y del sistema nervioso central (Cooper DN et al., 1991; Fowlis D et al., 1995). A pesar de la amplia disponibilidad de ratones genéticamente modificados, las cepas que carecen de mutaciones para las galectinas no han podido manifestar fenotipos “overt”, debido probablemente a la superposición parcial de la función de las galectinas (Colnot C et al.,

1998; Colnot C et al., 2001). Así, otros modelos tratables genéticamente dotados con un repertorio menos diversificado de galectinas tales como la *Drosophila* y el pez zebra se han convertido en atracciones alternativas de estudios de estas galectinas selectas con resultados prometedores (Pace KE et al., 2002; Ahmed H et al., 2004).

1.1.2.2. Funciones en la inmunidad innata y adaptativa

Las galectinas participan en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa (Vasta GR et al., 2009; van Die I et al., 2010). Los papeles recientemente propuestos de las galectinas en las funciones inmunes han recibido mayor soporte por su habilidad de reconocer directamente a los patógenos microbianos (Vasta GR et al., 2009), una propiedad bien caracterizada en otros tipos de lectinas, tales como las lectinas C y F, las ficolinas y las pentraxinas. Aunque los papeles de las lectinas en el reconocimiento no autólogo son particularmente críticas en los invertebrados, puesto que estos organismos carecen de inmunoglobulinas y rara vez dependen de los mecanismos de la inmunidad innata únicamente para el reconocimiento de patógenos microbianos potenciales (Vasta GR et al., 1999), la susceptibilidad/resistencia a varias enfermedades infecciosas en los humanos están determinadas por la presencia de ciertos alelos de lectinas (Dias Baruffi et al., 2010). Las galectinas tanto de vertebrados como de invertebrados reconocen varios patógenos virales, bacterianos y protozoarios parásitos (Vasta GR 2009). Las galectinas están localizadas y distribuidas de forma precisa en los tejidos de mamíferos, incluyendo la mayoría de las células del sistema inmune innato (células dendríticas, macrófagos, células mastocíticas, células asesinas naturales, células T gamma/delta y células B-1) y adaptado (células B y T activadas), así como en otros tipos celulares (Rabinovich GA et al., 2007; Stowel SR et al., 2008). Desde principios de los noventa el cuerpo de evidencia experimental (*in vitro* e *in vivo*) ha aumentado para apoyar los papeles de las galectinas expresadas por estas células y por las células del estroma circundante en el desarrollo y regulación de la homeostasis inmune innata y, así como en las respuestas a los retos infecciosos y alérgicos y al cáncer. Las galectinas liberadas por las células del estroma en compartimentos centrales contribuyen a la diferenciación de los precursores de las células inmunes. El desafío inmune y las diferentes condiciones patológicas pueden conducir a una posterior activación y diferenciación de las células inmunes, y modular la expresión y liberación de las galectinas al espacio extracelular donde pueden tener efectos autocrinos o paracrinos

sobre la regulación inmune. Las galectinas liberadas por las células inmunes pueden formar oligómeros y construir redes en la superficie celular que conducen a la activación de las vías de señalización transmembranales que modulan las funciones de las células inmunes, incluyendo, por ejemplo, la adhesión y migración celulares, la apoptosis de células T, y el equilibrio de citocinas Th1/Th2 (Rabinovich GA et al., 2007). Además, las galectinas liberadas en el ambiente extracelular bajo condiciones anormales pueden constituir “señales de peligro” o, ejercer su actividad sobre otras células, mediante los mastocitos, inducir la desgranulación y liberación de factores (histamina, por ejemplo) que representan las “señales de peligro” que conducen a la activación de los mecanismos inmunes en la ausencia del reto antigénico (Sato S et al., 2004).

Respecto a las respuestas inmunes de adaptación, se ha propuesto que las galectinas son reguladores de la homeostasis de las células inmunes (Rabinovich GA et al., 2002). Las interacciones entre las células del estroma de la médula ósea y los compartimentos tímicos y los precursores linfocíticos son críticos para su desarrollo, selección y posterior progreso hacia la periferia. En este aspecto, las interacciones mediadas por galectinas pueden modular la maduración y diferenciación de las células B en los compartimentos inmunes tanto centrales como periféricos (Rossi B et al., 2006). De forma similar, desde sus etapas tempranas de desarrollo en el compartimento tímico hasta la remoción de las células T activadas maduras en la periferia, la regulación de la supervivencia de las células T es crítica para una respuesta inmune controlada. La galectina-1 puede regular la proliferación de las células T y la apoptosis a través de la unión y agrupamiento de los glicoconjugados de la superficie celular ricos en lactosamina hacia los microdominios de membrana segregados (Rabinovich GA et al., 2007b). La galectina-1 puede tener efectos pro- y anti-apoptóticos sobre las células T dependiendo de la etapa de desarrollo y el estado de activación de la célula, y el microambiente en el que tiene lugar la exposición. No obstante, los efectos de la galectina-3 en la supervivencia de la célula T, dependen de si la proteína se produce endógenamente (anti-apoptótica) o por exposición exógena (pro-apoptótica) (Liu FT et al., 2007). Las galectinas también ejercen funciones reguladoras en la homeostasis de las células T y en las cascadas de señales provocadas por su unión, mientras que la formación de redes en la superficie de las células T tiene implicancias en varios eventos “corriente abajo” que modulan su diferenciación, activación funcional y producción de

citocinas anti- y pro-inflamatorias. Los efectos de las galectinas sobre la síntesis de citocinas por las células T hacen que la secreción final determine la polarización de Th1/Th2 de la respuesta inmune.

Mediante la reducción de IFN- γ y IL-2 y la producción aumentada de IL-5, IL-10 y TGF- β , la galectina-1 desvía el equilibrio de una respuesta Th1-polarizada hacia una respuesta Th2, mientras que al reducir los niveles de IL-5, la galectina-3 tiene el efecto opuesto (Yang R et al.,2008) . Finalmente, dados los papeles reguladores de las galectinas sobre las células que median la respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa, sus efectos pueden ser benéficos o perjudiciales en condiciones patológicas que se traducen en una respuesta inmune exacerbada o disminuida. Por ejemplo, en desórdenes inflamatorios, inmunológicos y autoinmunes, además del cáncer (Yang R et al., 2008).

En el contexto del sistema inmune la expresión de galectinas es baja en células vírgenes y en reposo pero aumenta considerablemente luego de un estímulo de activación y/o diferenciación, como en el caso de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados (Rabinovich et al., 1998; Rabinovich et al., 2004). Las galectinas pueden localizarse en diferentes compartimientos y se han descrito diversas funciones intracelulares y extracelulares para las mismas (Tabla 1.1.).

Tabla 1.1. Efectos de diversas galectinas sobre la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. (Tomado y modificado de Ilarregui 2009)

Galectina-1

- Induce apoptosis a células T activadas
- Se expresa en T activadas y Treg
- Induce estado de activación alternativa en macrófagos
- Participa en el escape tumoral de melanoma y linfoma

Galectina-2

- Induce apoptosis a células T activadas
- Modula citoquinas proinflamatorias

Galectina-3

- Extracelular: Induce apoptosis a células T activadas
- Intracelular: Tiene propiedades antiapoptóticas
- Induce la migración de monocitos y macrófagos

Galectina-4

- Induce la producción de IL-6 en células CD4+

Galectina-7

- Participa en la diferenciación de queratinocitos

Galectina-8

- Aumenta la adhesión de neutrófilos

Galectina-9

- Induce apoptosis de células T activadas
- Induce la maduración de células dendríticas y la secreción de IL-12
- Quimioatracción de Eosinófilos

Galectina-10

- Se expresa en eosinófilos y basófilos
- Contribuye la función de Treg

Galectina-12

- Participa en el control del ciclo celular
- Se expresa en tejido adiposo
- Participa en la diferenciación de adipositos

1.1.2.3. Las galectinas como receptores con patrones de reconocimiento (RPR)

Se ha descrito que las galectinas se unen a glicanos de la superficie de virus, bacterias, protistas y hongos (Vasta GR et al., 2009). Así, el papel potencial de las galectinas como RPR se ha convertido en un área de creciente atención. Además, la considerable diversidad del repertorio de galectinas en cada organismo y las variaciones substanciales o sutiles en la especificidad de cada galectina en relación con sus glicanos blanco, que es determinada por unidades repetitivas, ramificaciones o substituciones de oligosacáridos, sugiere que existe una extensa diversidad y plasticidad en la capacidad de las galectinas para el reconocimiento no autólogo. La presencia de células dendríticas canónicas y extendidos junto con las propiedades de unión independientes de carbohidratos que tiene la región N-terminal de la galectina-3, también sugiere que las galectinas tienen una capacidad de reconocimiento diversificada substancialmente. Asimismo, las galectinas de los tres tipos descritos (*proto*, *quimera* o *repetición en tandem*) pueden formar oligómeros, mientras que sus propiedades de unión multivalente, incluyendo la afinidad que están incrementadas. Evidentemente, capacitan a las galectinas para participar efectivamente, tanto en el reconocimiento directo de patógenos y parásitos como en los procesos “corriente abajo” que llevan a la modulación de las respuestas innata y adaptativa. Si el reconocimiento mediado por galectinas es un mecanismo de defensa efectivo con un claro beneficio para el huésped o no todavía está por aclararse, excepto en unos pocos ejemplos. Es digno de mencionar que un glicano particular en la superficie de un microorganismo o parásito puede ser reconocido por múltiples galectinas y que el resultado de la interacción difiere considerablemente dependiendo del tipo de galectina involucrada y de la concentración de la galectina en una superficie celular específica o en un determinado microambiente extracelular. Esto, en cambio, determina el nivel de formación de oligómeros y la cooperación de unión al ligando y la activación potencialmente antagonista o sinérgica de las vías de señales de patógenos (por ejemplo, la modulación de la activación inmune o la producción y secreción de citocinas) (Rabinovich GA et al., 2007a)

1.1.2.4. Galectina-1 en la regulación de la función de células T reguladoras (Treg)

La función supresora de los linfocitos Treg es esencial para el mantenimiento de la homeostasis periférica al regular el grado de activación de los linfocitos T durante la respuesta inmunológica. La carencia de la actividad de linfocitos Treg conduce a condiciones patológicas caracterizadas por una exacerbada respuesta inmunológica. En el 2007, Garín et al reportaron que los linfocitos Treg humanos sobreexpresan la galectina-1 y dicha expresión se incrementa en linfocitos Treg activados con anticuerpos anti-TCR. El bloqueo de la galectina-1 con anticuerpos monoclonales inhibe la actividad supresora de dichos linfocitos Treg, (Garín et al., 2007) sugiriendo que la galectina-1 es un regulador de la función de linfocitos Treg.

La Gal-1 es importante en la función inmunológica y la regeneración del músculo, pero su expresión y localización en los tejidos adultos y leucocitos siguen sin estar claros. Para estudiar este aspecto se ha obtenido un anticuerpo monoclonal específico contra la Gal-1, denominado α hGal-1, que define un epítipo capaz de reconocer la secuencia de péptidos, que conservan Gal-1 en humanos y porcinos, pero no Gal-1 en murino. Con el uso de la α hGal-1, encontraron que Gal-1 se expresa en una amplia gama de tejidos porcinos, incluyendo el músculo estriado, hígado, pulmón, cerebro, riñón, bazo e intestino. En la mayoría de los tipos de células, Gal-1 presenta una difusa expresión citosólica, pero en las células dentro de la pulpa roja del bazo, demuestran la localización de la Gal-1 tanto nuclear como citosólica. (Días Baruffi et al., 2010).

1.1.2.5. Infección del huésped mediada por galectinas inducida por patógenos y parásitos

En algunos casos, el reconocimiento de microbios por las galectinas del vector o del huésped promueve su adhesión, la entrada a la célula del huésped o la persistencia de la infección, además de modular la respuesta inmune del huésped. Así, estos patógenos y parásitos “subvertirían” los papeles de las galectinas como RPR del huésped o del vector para adherirse o lograr entrar a las células de éstos. Esto se ilustra claramente, por la participación de las interacciones de galectinas en los mecanismos de infección del VIH. En contraste con el papel inhibitorio de la galectina-1 en la fusión celular

mediada por paramixovirus, la galectina-1, que abunda en los órganos que representan los principales reservorios del VIH-1, tales como el timo y los nódulos linfáticos, promueven la infección por VIH-1 al facilitar la adhesión del virus al receptor CD4 y aumentar la eficacia de la infección (Ouellet M al., 2005; Mercier S et al., 2008). Estudios recientes mostraron que la galectina-1 aumenta la cinética de adsorción del VIH en los monocitos derivados de los macrófagos del huésped, lo que facilita la infectividad del VIH-1 al acortar el tiempo requerido para el establecimiento de la infección. Además, la galectina-1 también funcionaría como un receptor soluble “tipo basurero” e incrementa la ingestión del virus por los macrófagos que, junto con la evidencia de que la galectina-1 está presente en el líquido seminal, cabezas y colas de las espermátides tardías, llevó a extender la propuesta de que la galectina-1 también puede facilitar la transmisión sexual del VIH-1 (Mercier S et al., 2008).

1.2. Plaquetas

1.2.1. Introducción

La hemostasia supone un complejo conjunto de procesos que involucran al vaso lesionado, componentes tisulares, moléculas del plasma y elementos formes de la sangre. Por otra parte, tras la detención de la hemorragia se ponen en marcha mecanismos destinados a reparar la pared vascular y restablecer la circulación de la sangre a sus condiciones previas a la lesión.

La hemostasia consta de tres componentes principales, cuyos efectos se superponen parcialmente en el tiempo e interactúan entre sí:

La reacción vascular y plaquetaria produce la *hemostasia primaria*, que es reforzada y sostenida por el coágulo, cuya formación se denomina, por ello, *hemostasia secundaria*. En conjunto, las plaquetas aglutinadas y el coágulo constituyen un eficaz tapón hemostático. A su vez, dicho tapón estimula la reparación vascular. Una vez reparada la pared vascular, el tapón debe disolverse mediante *mecanismos fibrinolíticos* que permiten el restablecimiento de la circulación de la sangre.

1.2.2. Producción y características estructurales de las plaquetas.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos anucleados que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos de la médula ósea, las cuales son células extraordinariamente grandes (20 μm de diámetro), con un núcleo altamente poliploide y un citoplasma subdividido por capas de membranas onduladas. Se forman a partir de vesículas que se desprenden en grandes cantidades de las membranas externas de los megacariocitos. Circulan en la sangre en forma de disco (discocitos) de aproximadamente 3 μm de diámetro, 4 – 7 μm^3 de volumen y 10 pg de peso. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie. Su concentración normal en la sangre es de 150 a 350 x 10⁶/mL y su tiempo de vida media en sangre es de 7 a 10 días. Junto a los eritrocitos y leucocitos constituyen los elementos formes de la sangre. Poseen algunos elementos comunes a otras células y otros que las distinguen y caracterizan. (Bick RL. 1997; Morgorstern E 1997; García E et al., 2000)

El proceso de trombopoyesis dura aproximadamente 7 días. La trombopoyetina, una hormona con funciones similares a la eritropoyetina actúa estimulando el proceso de tromboyesis, dicho proceso exhibe algunas características asociadas a apoptosis, incluyendo la reorganización, la condensación de la membrana y el plegado del citoesqueleto. Se inicia a partir de una célula progenitora multipotencial común a las series, eritroide, mieloide y megacariocítica (CFU-GEMM). De esta célula derivan las células progenitoras comprometidas para megacariocitos (CFU-Meg). Tras una primera fase proliferativa, las células progenitoras sufren una intensa división nuclear sin división celular, dando lugar al megacarioblasto que es una célula gigante con un gran núcleo multilobulado y una carga cromosómica poliploide. En el megacarioblasto se inicia la maduración del citoplasma formándose los organoides en gran cantidad. Una vez completado este proceso madurativo, la célula se ha transformado en megacariocito. El megacariocito por último sufre un proceso de fragmentación de su citoplasma originándose las plaquetas o trombocitos que abandonan la médula ósea. Cada megacariocito produce entre 2.000 y 7.000 plaquetas. La regulación de la megacariocitopoyesis está determinada por la presencia intracelular de factores de transcripción en las células progenitoras y por citoquinas presentes en el microambiente medular (Gordge M.P., 2005; Gal Iglesias B et al, 2007). Se piensa que un proceso apoptótico especializado podría conducir la génesis de la plaqueta y su posterior

liberación. La apoptosis se ha descrito en los megacariocitos (Radley J.M. y Haller J.C., 1983) y se ha encontrado que es más prominente en megacariocitos maduros en comparación con las células inmaduras (Falcieri E. et al., 2000). Sin embargo, los mecanismos que regulan la apoptosis megacariocítica son poco conocidos. Por lo tanto, la transición del megacariocito a las plaquetas es un proceso complejo. Aunque los mecanismos básicos de la producción plaquetaria se han investigado, la aclaración de los controles moleculares específicos y de los acontecimientos celulares implicados en la formación y la liberación de la plaqueta es una tarea inconclusa. Por lo tanto, quedaría todavía dilucidar: (a) que factores inducen en megacariocitos inmaduros la formación de proplaquetas, (b) identificar el mecanismo de liberación de plaquetas a partir de las proplaquetas, y (c) comprender cómo el citoesqueleto conduce a los acontecimientos que dan lugar a la producción de las proplaquetas. El examen minucioso de los defectos genéticos que dan lugar a desórdenes de la plaqueta, además de los estudios moleculares, celulares y bioquímicos que continúan haciéndose en los megacariocitos, proporcionarán en un futuro, una comprensión más clara de estos procesos (Patel SR. et al., 2005).

La estructura de la plaqueta (Fig. 1.5.) se adapta a la gran variedad de funciones que deben desempeñar, con zonas anatómicas preferentemente dedicadas a cada una de ellas, a saber: en la *membrana plaquetaria* se producen las interacciones con el exterior, el *citoesqueleto* es el responsable de la contracción celular, los *gránulos específicos* almacenan sustancias prohemostáticas, procicatrizantes y activadoras de las propias plaquetas y los *sistemas membranosos* amplifican la superficie plaquetaria y alojan componentes químicos involucrados en la activación. Las plaquetas, además, poseen estructuras anatómicas destinadas a algunas funciones celulares inespecíficas, como el metabolismo energético, con una escasa capacidad de síntesis, y mecanismos de endocitosis y exocitosis. (Díaz- Ricart M et al., 1995)

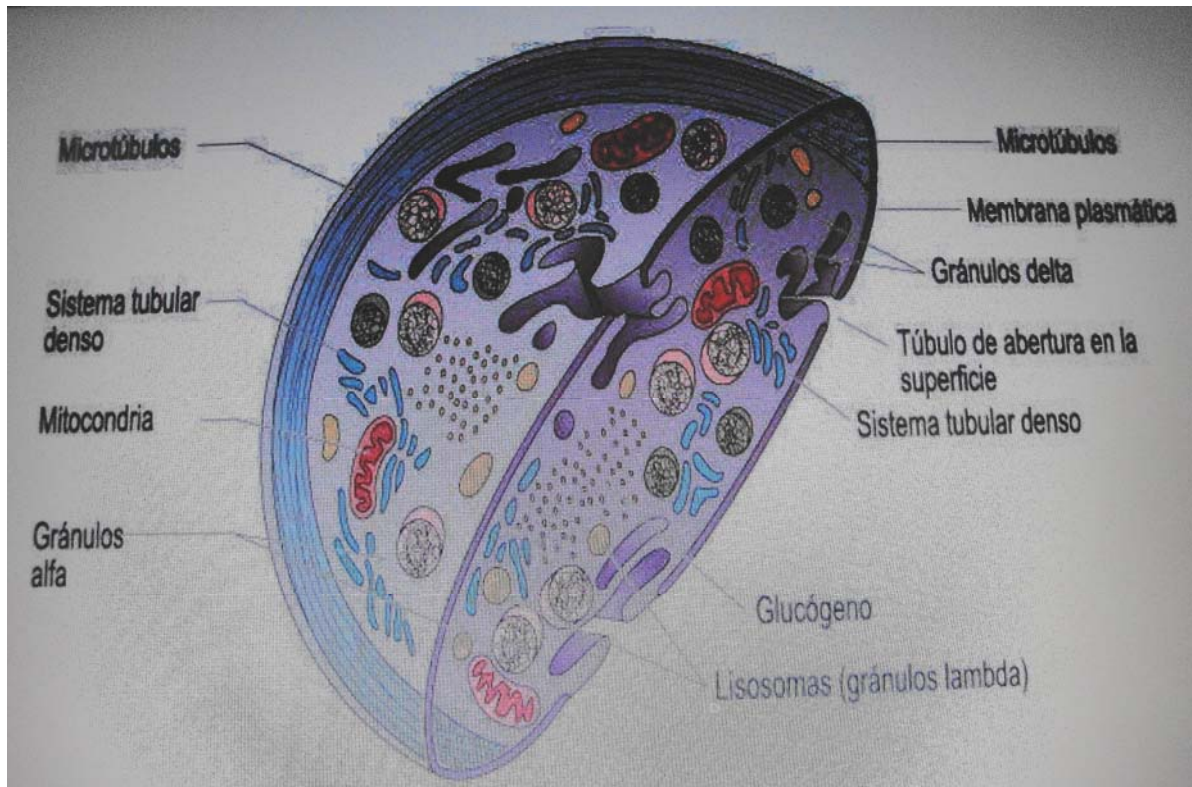


Figura. 1.5. Estructura de la Plaqueta

1.2.2.1. Membrana plasmática

La membrana plasmática de la plaqueta, como ocurre con otras células, media en las interacciones con el medio externo, ocupando, por eso, un papel central en su fisiología. Es una típica unidad de membrana con un contenido particular en determinados, fosfolípidos, glicolípidos, y glicoproteínas.

Los *fosfolípidos* son particularmente ricos en ácido araquidónico, el ácido graso precursor de la síntesis de eicosanoides, estas sustancias implicadas en la transmisión de las señales recibidas en la membrana. Los fosfolípidos se distribuyen asimétricamente en la bicapa y los que poseen carga negativa, tales como el fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina se localizan preferentemente en la capa interna. (Coller et al., 1984) Esta distribución tiene, también, un significado funcional, ya que sirven como sustratos para enzimas intracelulares (fosfolipasas) durante la activación plaquetaria. Algunos fosfolípidos y sus derivados tienen propiedades agregantes, sobre todo el factor activador de plaquetas (PAF), o actividad procoagulante, como es el caso del factor plaquetario 3 (PF3), y se tornan accesibles cuando la plaqueta es activada,

debido a una reorganización de los componentes de la membrana. (Moriau M et al., 1990). La membrana plaquetaria contiene un gran número de glicoproteínas con una o más cadenas ramificadas de polisacáridos, que forman parte de la cubierta exterior o "glicocálix", que confiere la carga negativa a la superficie de la plaqueta. (Nurden AT et al., 1987)

La membrana plasmática tiene una composición en *glicoproteínas* variable (Fig. 1.6.). Durante el proceso de secreción, se produce la fusión de las membranas de los gránulos intraplaquetarios con la membrana plasmática a través del SCA, lo que permite la exposición de antígenos internos en la superficie de la plaqueta. Glicoproteínas como la GMP140, que existe sólo en las membranas de los gránulos α , y la GP53 de la membrana de los lisosomas de las plaquetas en reposo, pasan a expresarse en la superficie después de la activación y secreción de las plaquetas. Así, la composición de la membrana plasmática depende del estado de activación de la plaqueta. (Nieuwenhuis HK et al., 1987; Stenberg PE et al., 1985; Monteiro MC et al., 2001) Las glicoproteínas clásicas han sido subclasificadas en distintas familias: integrinas, glicoproteínas ricas en leucina y selectinas. Las glicoproteínas de la membrana plaquetaria actúan como receptores, mediando, entre otras, en tres importantes funciones: en la adhesión de las plaquetas a componentes de la matriz extracelular de la pared vascular, en la agregación plaquetaria y en la interacción de las plaquetas con otras células. (Kieffer N et al., 1990).

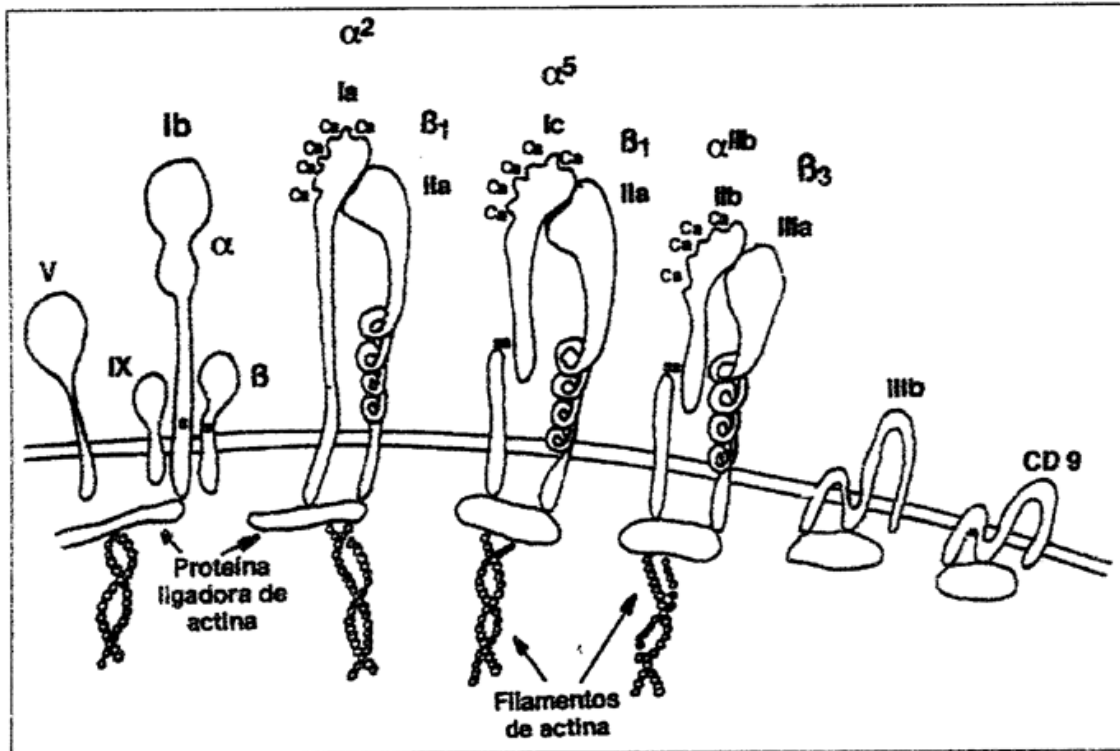


Figura 1.6. Esquema de la estructura de las principales glicoproteínas y receptores de membrana plaquetaria. Se muestran las subunidades que forman las glicoproteínas indicadas en el texto.

Diversos receptores han sido ya clonados, secuenciados e identificados, (Bennett JS et al., 1990; Peerschke EI 1992; Schmitz G al., 1998) al igual que sus características bioquímicas y funcionales.

1.2.2.2. Receptores de la familia de las integrinas

Las integrinas son una familia de glicoproteínas de la membrana implicadas en interacciones célula-matriz o célula-célula. Son heterodímeros constituidos por dos subunidades, α y β , y para la mayoría de estos receptores el lugar de reconocimiento en el ligando es el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD). Este grupo incluye cinco receptores de la membrana plaquetaria: GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP Ic/IIa, GP Ic'/IIa y el receptor de la vitronectina. (Lam SC et al., 1989; Ruoslahti E. 1991; Ginsberg M H et al., 1993)

a) GPIIb/IIIa

El complejo GPIIb/IIIa es la integrina más abundante y se encuentra en forma de heterodímeros $\alpha IIb\beta 3$, dependientes de calcio. Su función principal es la de receptor para el fibrinógeno, mediando la agregación plaquetaria. Las plaquetas normales

contienen alrededor de 50.000 complejos GPII/IIIa en la membrana plasmática; no obstante, otros de estos complejos están presentes en las membranas del SCA y de los gránulos α , y pueden expresarse en la superficie, después de la activación de las plaquetas. (Peerschke E et al., 1992; Shattil Setal.,1985)

El complejo GPIIb/IIIa actúa como receptor para otras proteínas adhesivas, además del fibrinógeno, tales como la fibronectina, el factor de von Willebrand (vWF) y la vitronectina. A través de uniones con estas proteínas adhesivas, interviene en el proceso de adhesión al subendotelio. Estos complejos solamente adquieren capacidad para interactuar con las proteínas adhesivas, después de la activación de la plaqueta. Tras la activación hay un incremento del número de complejos expuestos en la superficie, así como un incremento de su actividad resultante de alteraciones conformacionales que conducen a la exposición de los lugares de unión. El reconocimiento de los ligandos por el heterodímero implica la secuencia RGD y requiere Ca^{2+} y Mg^{2+} . (Shattil S et al., 1985; Kunicki T 1981; Phillips D et al.,1991).

La unión al fibrinógeno induce otras alteraciones conformacionales en el complejo, las cuales son responsables de la transmisión de señales al interior de la plaqueta. La participación del complejo en la transducción de la señal después de la activación celular, incluye la regulación de la fosforilación de tirosinas, intercambio de Na^+/H^+ , agregación de proteínas del citoesqueleto y entrada de calcio a través de la membrana. Por otra parte, el complejo GPIIb/IIIa interviene en la retracción del coágulo, uniendo la red de fibrina extracelular al aparato contráctil intracelular. (Parise L et al., 1990; Fujimoto T et al, .1991; Bachelot C et al., 1992; Shattil S et al, .1993) Por todo lo expuesto, podemos concluir que la presencia de GPIIb/IIIa es imprescindible para que haya agregación plaquetaria y hemostasia normal. Este hecho se evidencia en la enfermedad hemorrágica congénita designada por trombostenia de Glanzmann, determinada por la falta de este complejo funcional.

b) GPIa/IIa

GPIa/IIa es el receptor para el colágeno, corresponde al heterodímero $\alpha_2\beta_1$ y está presente en la plaqueta en un número aproximado de 2.000 moléculas por célula. Este receptor funciona en el proceso de adhesión a la matriz extracelular, y también está implicado en la agregación de las plaquetas inducida por el colágeno. La unión al

colágeno depende de Mg^{2+} y Mn^{2+} . (Clemetson K et al, 1991; Catimel B et el, .1991).

c) GPIc/IIa,GPIc'/IIa y el receptor de la vitronectina

GPIc/IIa, G Ic'/IIa y el receptor de la vitronectina, corresponden a las integrinas minoritarias de la membrana plaquetaria $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta$ y $\alpha_v\beta$, y son, respectivamente, los receptores para la fibronectina, laminina y vitronectina (Clemetson K et al., 1991; Catimel B et al., 1991; Preissner K et al.,1991)

1.2.2.3. Glicoproteínas ricas en leucina (LRG)

A la familia de las glicoproteínas ricas en leucina pertenecen proteínas con funciones muy diversas, que tienen en común la presencia de un número variado de copias de un segmento, con una secuencia de 24 residuos de aminoácidos rica en leucina (LRG). En este grupo está incluido el complejo GP Ib/IX/V de la membrana plaquetaria. (Clemetson K et al., 1991; Roth G et al., 1991, Modderman P et al., 1992)

a) GPIb/IX/V

El complejo glicoproteico GPIb/IX/V es un receptor específico implicado en la adhesión y agregación plaquetaria. Es el principal responsable de la adhesión de las plaquetas al subendotelio en zonas vasculares donde prevalecen condiciones de flujo caracterizadas por una elevada tensión de cizallamiento. Éste complejo interactúa con las estructuras subendoteliales, principalmente con el colágeno, a través de un ligando adhesivo, el factor de von Willebrand (vWF). El vWF es una proteína multimérica constituyente de la matriz subendotelial, que está presente en los gránulos α de la plaqueta, desde donde es secretado durante la activación, y circula en la sangre formando un complejo con el factor VIII de la coagulación (FVIII:c) (Fressinaud E et al.,1991;Meyer D et al.,1993)

El receptor GPIb/IX/V también funciona como lugar de unión de alta afinidad para la trombina, participando en la propagación de la respuesta a este importante agonista en la activación y agregación plaquetaria. (Roth G et al., 1991; Ruggeri Z et al., 1991) Se estima que el número de moléculas de este complejo se aproxima a 25.000 / plaqueta, siendo la segunda glicoproteína más abundante de la membrana citoplasmática. La GPIb es la principal sialoglicoproteína de la membrana de las

plaquetas y, como tal, es responsable en gran medida de la carga negativa de las plaquetas y de su comportamiento electroforético. (Nurden AT et al., 1987; Ruggeri Z et al., 1991).

Aproximadamente el 70% de la GPIb total de la membrana está asociada a la actina y esta asociación al citoesqueleto puede estar relacionada, tanto con el mantenimiento de la forma de la plaqueta, como con la función de unión del vWF. En las plaquetas en reposo, el complejo está unido al citoesqueleto a través de la proteína ligadora de actina (ABP) y su exposición en la superficie disminuye después de la activación. (Fox J et al., 1987; Michelson A et al., 1992; Nurden P et al., 1997).

La fosforilación de receptores de la membrana puede constituir un importante mecanismo de transducción de la señal después de la unión del respectivo ligando. Sin embargo, la fosforilación de esta proteína no parece estar implicada en la transmisión de la señal ni en la activación plaquetaria. Al contrario, existen evidencias de que la fosforilación de la serina 166 en el dominio citoplasmático de la GP Ib puede ser, en parte, responsable del mantenimiento de la plaqueta en estado de reposo. (Fox J et al., 1987; Ruggeri Z et al., 1991; Ternisien C et al., 1991)

El complejo GPIb/IX/V es esencial para la normal adhesión y activación plaquetaria, lo que se evidencia en los pacientes deficientes en este complejo. Tales alteraciones resultan de anomalías congénitas, conocidas como síndrome de Bernard-Soulier, y conducen a una tendencia hemorrágica, la cual puede ser extremadamente severa. (Nurden AT et al., 1981; Clemetson K et al., 1982).

b) Otros receptores:

c) GPIV:

La GPIV es una glicoproteína mayoritaria de la membrana plaquetaria y funciona como receptor para la trombospondina. Existen alrededor de 23.000 moléculas de GPIV por plaqueta, encontrándose la mayor parte de éstas en la membrana citoplasmática de la plaqueta en reposo. Se demostró la presencia de esta glicoproteína en la membrana de los gránulos α , y el aumento de su expresión en la superficie después de la estimulación de las plaquetas con trombina. (George J et al., 1986; Berger G et al.,

.1996).

Los lípidos y las proteínas en la membrana plasmática están desigualmente distribuidos y forman distintos microdominios denominados dominios de membrana enriquecidos con glicolípidos (GEMs), identificados en la mayoría de las células y caracterizados por su composición en lípidos (glicoesfingolípidos, fosfolípidos saturados y colesterol) y proteínas (Simona K y Ikonen E, 1997). En plaquetas en reposo, los GEMs se distribuyen uniformemente en la membrana plasmática, pero luego de la estimulación plaquetaria por colágeno o por trombina se produce la unión rápida de los mismos (“clustering”) (Bodin S et al., 2003). La presencia de una variedad de receptores proteicos de membrana en los GEMs lipídicos tales como CD36, GPVI, GPIb-IX-V, y Fc γ RIIa (Doria DJ et al., 1996; Wonerow P et al., 2002; Locke D et al., 2002; Shrimpton CN et al., 2002; Bodin S et al., 2003) así como las proteínas implicadas en la señalización celular tales como LAT (proteínas adaptadoras de transmembrana), quinasas de la familia de tirosin-Src (Fyn y Lyn) y fosfatidilinositol fosfato (Bodin S et al. 2003), llevaron a concluir que estos dominios lipídicos desempeñan un papel importante en el proceso de transducción de señales de activación, demostrado con trombina o colágeno (Bodin S et al. 2003).

Por otro lado, se sabe que el colágeno tipo I y tipo III son moléculas trombogénicas vasculares que se localizan en el subendotelio. Se exponen rápidamente luego de una lesión vascular, para interactuar con las plaquetas, participando de esta manera en la fase temprana de la hemostasia. Varios receptores plaquetarios para el colágeno se han descrito en la literatura, los más importantes fisiológicamente son GPIIb/IIIa (integrina α 2 β 1) y GPVI (Nieswandt B y Watson SP 2003).

Se ha descrito un receptor para el colágeno de tipo III, denominado TIIICBP (proteína que une al colágeno tipo III de 68-72 kDa) (Monnet E y Fauvel-Lafeve, 2000), que reconoce específicamente una secuencia octapéptica del colágeno tipo III humano. Este octapéptido representa una secuencia mínima del colágeno tipo III capaz de interactuar con la plaqueta (Fauvel F et al., 1979). La unión del octapéptido a las plaquetas induce la fosforilación de TIIICBP y de otras proteínas implicadas en la señalización de la activación plaquetaria por colágeno, tal como la cadena c de la región Fc del receptor de inmunoglobulina y la proteína LAT (Maurice P et al., 2004). Se ha investigado la localización de TIIICBP en plaquetas y se ha demostrado que está

asociado a la membrana plasmática y al SCA en plaquetas en reposo, y se redistribuye al exterior de la membrana plasmática cuando la plaqueta se activa por colágeno. También, durante la activación plaquetaria inducida por colágeno, la GPVI juega un papel esencial en la transducción de señal, migra en los GEMs y se une con uniones no covalentes a la cadena c de FcR (Locke D et al. 2002), la cual contiene un motivo de activación del inmunoreceptor tirosina (ITAM). El ITAM es fosforilado por la familia de Src tirosinquinasa, Fyn y Lyn, constitutivamente asociados con dominios citoplasmáticos de GPVI (Suzuki K-Inoue et al. 2002). La asociación entre la GPVI y la cadena c de FcR ocurre en los GEMs y varios estudios han demostrado que la ausencia de GPVI (Nieswandt B et al. 2001; Kato K et al. 2003; Kuijpers M Jet al. 2003), su anulación por anticuerpos específicos (Lecut C et al. 2003; Siljander PR et al. 2004) o la competición con una forma soluble de GPVI (Massberg S et al. 2004; Grüner S et al. 2005) inhibe la formación de la agregación plaquetaria superficial en condiciones de flujo normales. Por lo tanto, la presencia de TIIICBP en los GEMs, en asociación con la cadena c de FcR, sugiere que existe una cooperación potencial entre TIIICBP y la GPVI. El TIIICBP podría asociarse con la GPVI que se mueve a los GEMs durante la agregación plaquetaria por colágeno tipo III y contribuir a la activación completa de PLCc2, movilización de calcio y a la activación de GPIIbIIIa (Maurice P. et al. 2004).

Se sabe que la unión de antagonistas a TIIICBP, puede deteriorar la transferencia de GPVI a los GEMs, y su asociación con la cadena c de FcR. Finalmente, la localización de TIIICBP en los GEMs y su asociación con la elasticidad del citoesqueleto, daría información sobre la naturaleza física de este receptor, como por ejemplo, que contendría un dominio transmembrana altamente hidrofóbico y una cola citoplásmica capaz de unir a las proteínas del citoesqueleto (Maurice P. et al., 2006).

1.2.2.4. Citoesqueleto plaquetario

El citoesqueleto de la plaqueta consiste en una red de estructuras filamentosas que mantienen la forma discoide de la plaqueta en reposo. (Isenberg et al., 1995; Patel et al., 2005) Incluyen filamentos de actina, (Debus E et al., 1981, Zobel CR 2001), el anillo marginal de microtúbulos, (White JG et al., 1986), moléculas de miosina (Tanaka K et al., 1998) así como moléculas de unión a actina como filamina, espectrina, vinculina, talina, tropomiosina entre otras, todos ellos formando el esqueleto membranoso y

citoplásmico plaquetario. Por otro lado, el citoesqueleto tiene el papel de dirigir y promover los cambios rápidos de forma inducidos por la activación plaquetaria. (Fox JE 2001; García E et al, 2006).

Dentro de las proteínas entrecruzadoras de actina filamentosa (Actina- F) como la espectrina, la fibrina o la alfa actinina, la filamina A (FLNa) es la más eficiente en formar geles ortogonales tridimensionales con actina. Además, une al citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas de membrana. La filamina mantiene la citoarquitectura plaquetaria y es esencial para el movimiento, cambio de formas que suceden durante la activación plaquetaria. Estudios previos han mostrado que una gran variedad de proteínas con distintas funciones tales como transducción de señales, regulación de la transcripción de genes y movilización de receptores se asocian a la filamina, sugiriendo que ésta puede actuar como andamiaje u organizador de proteínas. (García E et al, 2006) La actividad del citoesqueleto depende de tres tipos de filamentos: a) filamentos de actina (microfilamentos), formados por monómeros de actina y proteínas accesorias entrecruzadoras de actina, entre las que destaca la filamina, b) microtúbulos formados por tubulina y proteínas accesorias a ésta, como la proteína tau y c) filamentos intermedios que incluyen proteínas como la vimentina o la laminina. (García E et al, 2006)

Otras proteínas que se han encontrado en la membrana del citoesqueleto son: talina, vinculina, proteína relacionada con distrofina, moléculas implicadas en señales de transducción y varias isoenzimas como las proteínas quinasas C. La proteína vimentina (PM 58 kDa), es un importante componente de filamentos intermedios, está presente en plaquetas y puede contribuir a la interacción del citoesqueleto con la membrana. Las interacciones con el citoesqueleto pueden tener un papel en el traslado de ciertos receptores desde la superficie de las plaquetas hacia el interior y viceversa, vía el SCA. El citoesqueleto asociado a membrana tiene un rol importante en el “spreading” plaquetario, que ocurre luego de la adhesión.

La plaqueta responde al daño vascular rápidamente deformándose, primero convirtiéndose en redonda, y luego extendiendo los filopodios y lamelipodios (filopodios anchos). Estos cambios morfológicos requieren alteraciones en el esqueleto de la membrana como también en la remodelación de la actina. El citoesqueleto de la

membrana de la plaqueta es una red planar armada, sobre todo, por las moléculas de espectrina. La espectrina es la base uniforme del esqueleto, sostiene a la membrana plasmática en las plaquetas en reposo y la remodela y centraliza uniformemente, en plaquetas activadas. Otra proteína es la α -adducina, es una fosfoproteína que forma un complejo ternario con la F-actina y la espectrina; en su forma desfosforilada se encuentra ubicada en la unión de los filamentos de actina a los extremos de las moléculas de espectrina. Luego de la activación plaquetaria, la fosforilación de la α -adducina en la posición Ser726 produce el desprendimiento de la espectrina y de la F-actina. La liberación de la α -adducina, proveniente de la espectrina, facilita la centralización del esqueleto de la membrana durante el “spreading” plaquetario; la liberación de la α -adducina proveniente de la F-actina expone los extremos libres de la actina, los cuales contribuyen a las reacciones de ensamblado de la actina en los filopodios. Se piensa que, como la α -adducina interactúa con los extremos de actina y de espectrina, permitiría terminar el montaje del esqueleto de la membrana de la plaqueta en reposo. Por lo tanto, la disociación de la fosfoadducina participaría en el cambio de forma plaquetario que se produce por la activación, de la forma de disco (plaqueta en reposo) a la forma esférica (plaqueta activada) (Barkalow KL et al., 2003).

Aunque ha habido avances en el conocimiento del papel del citoesqueleto en la secreción granular plaquetaria quedan aspectos por dilucidarse. La actina del citoesqueleto regula diferencialmente la secreción de los gránulos α y densos, en respuesta a los agonistas débiles. Se ha sugerido que la actina del citoesqueleto en reposo sirve como barrera para la secreción de gránulos α y densos, y que se requeriría una polimerización para la secreción de los gránulos α pero no necesariamente para la secreción de los gránulos densos. Se ha demostrado que la actina se requiere para un evento terminal que conduciría a la fusión de la membrana. Aproximadamente el 40% de actina en la plaqueta en reposo se organiza en filamentos, formando una barrera entre el citosol y la membrana plasmática. Se sabe que el anillo cortical de actina que delimita la cara de la membrana plasmática del citosol, es de 53 Å, en células neuroendocrinas y, podría servir como barrera, evitando la secreción, pues se desarma en el fenómeno de exocitosis. Sin embargo todavía es confuso el mecanismo por el cual impide la liberación de los gránulos en la plaqueta en reposo. Como apoyo a este modelo se encontraron los gránulos α plaquetarios cubiertos con F-actina, indicando entonces que podría servir como barrera a la membrana de fusión; sin embargo el papel

de dicha capa no está totalmente dilucidado. Por lo tanto, no está totalmente definido si la membrana plasmática y/o los gránulos asociados a la actina, así como el esqueleto o los microtúbulos de la membrana, contribuirían al efecto de barrera del citoesqueleto de la plaqueta en reposo (Flaumenhaft R. et al., 2005).

La proteína cofilina ha sido recientemente descrita, siendo esencial para la dinámica mediada por la actina, en la remodelación y la señalización interna proveniente de estímulos externos en plaquetas activadas. Pertenece a una familia de pequeñas moléculas de (18 a 21 kDa), y en plaquetas humanas se expresa la isoforma 1. La cofilina está regulada negativamente por fosforilación sobre la posición Ser3 y se ha establecido que la desfosforilación de la cofilina acompaña a la activación por agonistas, incluyendo a la trombina y a los ésteres del forbol. Se le ha atribuido una función central en las señales sostenidas, generadas por el receptor GPIIb/IIIa (α Ib β III), manteniéndose en su forma activa desfosforilada, generando como resultado final la agregación plaquetaria (Falet H. et al., 2005).

a) Microtúbulos

En las plaquetas en reposo, los microtúbulos son los únicos componentes del citoesqueleto visibles al microscopio electrónico. Son estructuras tubulares constituidas por 13 subfilamentos de tubulina y cada subfilamento es una sucesión alternada de tubulina α y β , proteínas globulares de peso molecular 55kDa. Parecen estar dispuestos en haces de 8 a 24 anillos de microtúbulos pero, en realidad, se trata de uno sólo enrollado en espiral, muy cerca de la membrana celular, siguiendo la circunferencia mayor de la plaqueta. El haz de microtúbulos, responsable del mantenimiento de la forma discoide de las plaquetas en reposo, se deforma durante el proceso de activación, se fragmenta transitoriamente y se reensambla en una posición más central, circundando los gránulos plaquetarios. (Monteiro MC et al., 2001)

Aproximadamente el 60 por ciento de la tubulina plaquetaria se encuentra en los microtúbulos y existe un equilibrio dinámico entre la tubulina polimerizada y las subunidades de tubulina libre. Los microtúbulos de tubulina juegan una función dual en el almacenamiento y la entrada funcional del Ca (2+) pues actúan como barrera; esta función está regulada por el sistema tubular denso (STD) pero también actúan como soporte del sitio de almacenamiento del Ca (2+) (Redondo PC, 2007).

b) Microfilamentos

Están compuestos básicamente por actina filamentosa y miosina. Se disponen en redes irregulares por toda la célula, desde la zona externa a los microtúbulos hasta el citoplasma profundo, y son los principales elementos contráctiles de la plaqueta. (Moix 2001)

1.2.2.5. Organelas

a) Gránulos Plaquetarios

Los gránulos α son en su gran mayoría los más abundantes aproximadamente de 50-80 por plaqueta, con un tamaño que varía de 200-500 nm. Comprende el 10% del volumen de la plaqueta, 10 veces más que el de los gránulos densos. El área total de la superficie de membrana de los gránulos α es de $14 \mu\text{m}^2$, 8 veces más que los gránulos densos y aproximadamente igual a la del SCA. (Price B et al., 2009).

Los gránulos α almacenan proteínas, muchas de las cuales tienen un papel esencial en la hemostasia. Su contenido procede de varias vías: síntesis endógena, endocitosis o pinocitosis. Contienen fibrinógeno, FvW, factor V, fibronectina, $\alpha 1$ antitripsina, factor plaquetario de tipo 4 (capaz de neutralizar la heparina al competir con la antitrombina), β - tromboglobulina, albúmina, PAI-1 y factor de crecimiento plaquetario (promueve la reparación hística). Así mismo, en la cara interna de la membrana granular se sitúan diversas proteínas, como la GPIIb-IIIa o la GP140 (P-selectina) que, al activarse la plaqueta, migran hacia la superficie celular y se expresan en la superficie de la membrana. Tras la fusión de los gránulos α con la membrana plasmática se incrementa un 30-35% la densidad de la GPIIb-IIIa en la superficie. (Llau Pitarch., 2010).

Algunos autores han descrito una pequeña proporción de cuerpos multivesiculares (CMV) en las plaquetas. Se trata de estructuras granulares de tamaño similar al de los gránulos α , que contienen diversas vesículas redondeadas de 30-70nm de diámetro, a veces acompañadas de una material electrodensito (Moix Pujol 2001). La observación ocasional de alguna de estas vesículas en la periferia de los gránulos α han sugerido que los CMV podrían representar un estadio precoz del desarrollo de los gránulos.

b) Gránulos densos

Los gránulos densos miden aproximadamente 200-300 nm de diámetro y poseen una morfología muy característica, con una zona central altamente densa rodeada por un halo transparente. Esta alta densidad electrónica está dada por el elevado contenido de Calcio y fósforo inorgánico (50% del total). (Moix Pujol 2001).

También se pueden visualizar por microscopía de fluorescencia, debido a la habilidad de incorporar colorantes fluorescentes derivados de la quinidina.

Los gránulos densos contienen altas concentraciones de serotonina, tomada del plasma por un transportador de la membrana plasmática y atrapada posteriormente en esos cuerpos. El atrapamiento de la serotonina puede ser consecuencia del menor pH (6.1) mantenido en los gránulos densos debido a la acción de una ATPasa que bombea H^+ en la membrana del cuerpo denso. Se encuentran altos niveles de adenosina 5'-difosfato (ADP) y la adenosina 5'-trifosfato (ATP) que están altamente concentradas en los cuerpos densos (ATP: ADP= 2:3) contrariamente a sus concentraciones relativas en el citoplasma (ATP: ADP= 8:1) (Holmsen H, 1993).

La membrana de los gránulos densos contiene glicoproteínas que también se encuentran en la membrana plasmática y en la membrana de los gránulos α y lisosomas incluyendo CD36, LAMP-2, P-selectina, GPIIb/IIIa y GPIb/IX. La liberación del contenido del gránulo denso de las plaquetas activadas constituye un importante mecanismo de retroalimentación positiva para la agregación plaquetaria, puesto que el ADP es un agonista plaquetario potente y la serotonina es un agonista débil. El ATP liberado de las plaquetas también puede servir como una fuente de fosfato de alta energía para las quinasas plaquetarias, que pueden fosforilar a varias proteínas, incluyendo GPIV (Naik UP et al., 1991; Marcus AJ et al., 1997). El número de gránulos densos aumenta con la edad, alcanzando su máxima hacia los 40 años. (Moix Pujol., 2001).

c) Estructuras Inespecíficas

Las plaquetas poseen escasos **lisosomas primarios y secundarios**. Los primarios son de morfología similar a la de los gránulos α algo más pequeños (175-250 nm de diámetro), sin nucleóide y rodeados por un halo más claro (Sixma JJ et al, 1985;

Stenberg y Hill, 1999; Moix Pujol., 2001). Contienen hidrolasas ácidas y ejercen las mismas funciones que en las demás células, incluyendo las relacionadas con la fagocitosis y la destrucción intracelular de partículas extrañas. Durante la secreción, se ha demostrado que liberan su contenido, aunque lo hacen en forma más lenta e incompleta que los gránulos específicos, sugiriendo que desempeñan una función más importante en la lisis del trombo que en la respuesta hemostática primaria. Además de modo comparable a lo que acontece con algunas sustancias de los gránulos α , también se ha detectado la exposición de proteínas lisosómicas en la superficie plaquetaria durante la activación como CD63 o LAMP (glucoproteína de la membrana lisosómica) y LAMP2 (Moix Pujol., 2001).

Los lisosomas secundarios ofrecen morfologías muy variadas y especialmente en plaquetas envejecidas; producen imágenes de autofagia local. Se ha sugerido que los lisosomas también están implicados en la captación de sustancias desde el plasma mediante endocitosis de fase fluida, comenzando con la formación de endosoma en una membrana del SCA, la cual luego se fusionaría con el lisosoma.

Un mecanismo alternativo de endocitosis de fase fluida, mediada por receptores, sería a través de las vesículas revestidas, que son unas formaciones de aproximadamente de 70-90 nm que se generan desde la membrana plaquetaria o del SCA como pequeñas depresiones revestidas por la clatrina. Esta es una proteína fibrosa que les confiere una estructura poliédrica característica que luego se transforman en vesículas y se fusionan con los gránulos, depositando en ellos el material captado.

Las plaquetas también contienen un número reducido de **microperoxisomas**, un tipo especial de gránulos, de unos 90 nm de diámetro, en los que por citoquímica, es posible detectar catalasa.

Las **mitocondrias** se hallan en proporción similar a la de los gránulos densos; son redondeadas o alargadas y tienen las típicas crestas en su interior, aunque son de tamaño algo inferior al de las restantes células. Su rol está en función del metabolismo energético plaquetario. Finalmente las plaquetas normales son muy pobres en **ribosomas** y, raramente, contienen retículo endoplásmico rugoso RER o vesículas del aparato de Golgi.

1.2.2.6. Sistema canalicular abierto

El SCA se presenta como una red de vesículas y canales, interconectados, que se ramifican a través de todo el citoplasma y comunican con la superficie exterior. Tienen una localización preferencial bajo la membrana celular y están aparentemente desprovistos del contenido.

El SCA consiste en invaginaciones de la membrana citoplasmática de la cual deriva su estructura, estando la cara interna de estas vesículas revestida por un depósito floculoso idéntico al glicocálix. (Coller BS et al., 1984; Moriau M et al., 1990; Monteiro MC et al., 2001).

El SCA tiene varias funciones, proporciona un mecanismo de entrada de elementos externos al interior de la plaqueta, también proporciona una vía potencial para la liberación del contenido de los gránulos al exterior, eliminando la necesidad de la fusión del gránulo con la propia membrana plasmática, función realmente importante debido a que en la plaqueta activada los gránulos se trasladan hacia el centro de la plaqueta en vez de hacerlo hacia la periferia (White JG, 1974). Sin embargo, aún hay controversia respecto a la frecuencia relativa con la que tiene lugar la secreción a través del SCA frente a la fusión directa con la membrana plasmática.

El SCA también representa un importante depósito interno de la membrana. La mayor parte de la membrana del SCA contribuye probablemente al aumento de la membrana plasmática para la formación de filopodios y también para la expansión plaquetaria después de la adhesión; las membranas de los gránulos α , cuerpos densos y, en menor grado, los lisosomas, también pueden contribuir, pero solo si el estímulo es suficiente para inducir la fusión de estas organelas con la membrana plasmática. También la membrana del SCA puede servir como un lugar de almacenamiento para las glicoproteínas de la membrana plasmática. Por ejemplo, en determinadas situaciones, la activación plaquetaria por parte de la trombina da lugar a la pérdida consistente y selectiva de GPIIb/IX de la superficie de la plaqueta; la microscopía electrónica muestra que la GPIIb/IX está secuestrada en el SCA (Michelson AD, 1990; Nurden P et al., 1994). Por otra parte la plasmina puede producir un fenómeno similar. La activación de la plaqueta produce un aumento en la GPIIb/IIIa de superficie, y aunque se piensa que la mayor parte de ella procede de las membranas de los gránulos α , al menos alguna parte

puede proceder de las membranas de los cuerpos densos y del SCA (Suzuki H. et al, 1992).

1.2.2.7. Sistema tubular denso

Al microscopio electrónico (ME) el STD se presenta como un conjunto de tubos apretados y cortos, que se distinguen del SCA por su opacidad, similar al del citoplasma que los circunda. Estos tubos forman una red continua por todo el citoplasma, siendo más apretada en la periferia que en el centro de la célula. El STD puede estar en asociación íntima, tanto con los microtúbulos, como con el SCA. Sus membranas derivan del retículo endoplasmático de los megacariocitos. (Moriau M et al ., 1990).

El STD se ha comparado con el retículo sarcoplásmico del músculo, debido a que puede secuestrar calcio iónico a una concentración de Ca^{2+} en reposo igual a 90nM y liberarlo cuando las plaquetas son activadas. La calreticulina, una proteína que se une al calcio, localizada en el sistema canalicular denso, probablemente ayuda a secuestrar calcio (Michalak M. et al., 1998).

La membrana del STD es probablemente un lugar importante para la síntesis de prostaglandinas y tromboxano; de hecho, la actividad peroxidasa utilizada para identificar el STD es un componente enzimático de la síntesis de prostaglandinas (Picot D. et al., 1994).

1.2.3. Fisiología y bioquímica de las plaquetas

En condiciones normales, la luz de los vasos sanguíneos está cubierta con una monocapa de células endoteliales continua, que es la principal responsable del mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos, y de la reología sanguínea (Tabla 1.2.). Si se produce una ruptura de continuidad en el endotelio, con exposición del colágeno subendotelial, se inician los procesos de la hemostasia primaria, con la interacción entre la plaqueta y la superficie vascular dañada. Esta interacción plaqueta-endotelio juega un papel crítico en el desarrollo de los procesos trombóticos. (Marcus et,al 1993). Cuando se produce una alteración o ruptura de un vaso, este se contrae, y las plaquetas interaccionan con sus estructuras subendoteliales, iniciando las etapas de adhesión, agregación, activación y reclutamiento plaquetario (Fig. 1.7.). El daño

vascular también sirve como señal para el inicio de la cascada de la coagulación, que dará lugar a la formación de trombina, otro importante inductor plaquetario que contribuirá a la formación del trombo y de fibrina que facilitará la consolidación del mismo. (Diaz R et.,al 1995)

Tabla 1.2. Componentes de la pared del vaso sanguíneo que son hemostáticamente activos.	
1. Subendotelio	
	Factor Von Willebrand
	Colágeno
	Fibronectina
	Trombospondina
	Laminina
	Vitronectina
	Fibrinógeno (fibrina)
	Factor tisular
2. Media	
	Colágeno (tipos I y III)
3. Adventicia	
	Colágeno (tipos I y III)
	Factor tisular

Tomado de Beutler et al., 2000.

La activación plaquetaria es un proceso complejo, que se inicia en la superficie de la membrana tras la interacción de un agonista a su receptor.

Después de producirse daño endotelial, las proteínas de la matriz subendotelial quedan expuestas (colágeno y factor de von Willebrand) y el contenido de los cuerpos Weibel Palade (factor de von Willebrand y P-selectina entre otras) de las células endoteliales se libera inmediatamente a la luz vascular.

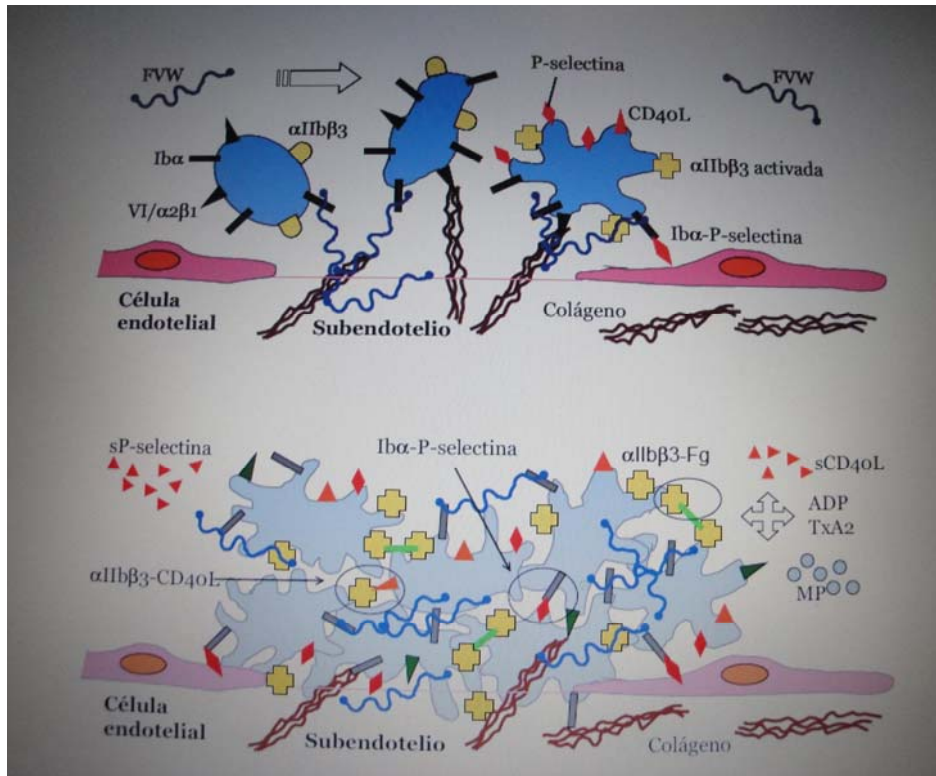


Figura 1.7. Adhesión, activación y agregación plaquetaria. Tras la lesión endotelial se produce la exposición del subendotelio que contiene substratos trombogénicos tales como el factor tisular (no mostrado), el factor de von Willebrand (FVW) y el colágeno. La plaqueta en reposo circula con una morfología discoidea, y tras su activación por contacto con el subendotelio (unión del factor de von Willebrand con la glicoproteína $Ib\alpha$ y del colágeno con las glicoproteínas VI y $\alpha2\beta1$), se genera un cambio de forma con la emisión de pseudópodos, degranulación y la expresión de determinadas proteínas de superficie (P-selectina, CD40 ligando y $Ib\beta/IIIa$ o $\alpha IIb\beta3$ activada). Al mismo tiempo se liberan determinados mediadores solubles (P-selectina soluble y CD40 ligando solubles, ADP, Tromboxano A2) y micropartículas (MP). Finalmente se produce un tapón plaquetario como consecuencia de la interacción entre moléculas de adhesión del subendotelio, además de la unión de la P-selectina con la glicoproteína $Ib\alpha$, el CD40 ligando con la glucoproteína $\alpha IIb\beta3$ y ésta última con el fibrinógeno (Fg) que contienen las plaquetas activadas (Hagberg IA et al., 2000; McEver RP et al., 20001; Bennet JS et al., 2005; Jackson SP et al., 2007; Furie B et al., 2008)

Ello condiciona la interacción del factor de von Willebrand con la glicoproteína $Ib\alpha$, y la del colágeno con las glicoproteínas VI y $\alpha\beta1$, y la subsiguiente activación plaquetaria.

Dos vías intracelulares están implicadas en la activación: la de los fosfoinosítoles y la metabólica del ácido araquidónico, que se inician con la hidrólisis enzimática de los fosfolípidos específicos de la membrana plaquetaria. Todo este proceso se acompaña de un cambio en la forma de la plaqueta y de la glicoproteína IIb/IIIa, así como de la rápida secreción del contenido de los gránulos (Tablas 1.3.1., 1.3.2. y 1.3.3.). (Hagberg IA y Lyberg T, 2000; Flaumenhanft R, 2003; Jackson SP , 2007; Rivera J et al., 2009). La glicoproteína IIb/IIIa (α IIb β 3) activada se une con el factor von Willebrand, el fibrinógeno y la fibronectina para causar agregación plaquetaria y finalmente la formación de un tapón plaquetario (Hagberg IA y Lyberg T, 2000, McEver RP, 2000; Bennett JS, 2005; Jackson SP, 2007; Furie B y Furie, 2008).

Tablas 1.3.1., 1.3.2. y 1.3.3. Características de los receptores plaquetarios

Tabla 1.3.1. Glicoproteínas de adhesión plaquetarias		
Receptores plaquetarios conocidos	Concentración plaquetaria μg/ml	Lugares de síntesis
GPIa/IIa ($\alpha 2b1$; CD49b/CD29; VLA-2) GPIV (CD36) GPVI	-	Fibroblastos
GPIb (CD42b,c) GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; CD41/CD61)	34	Células endoteliales, megacariocitos
GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; CD41/CD61) $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61)	7,3	Hepatocitos
GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; CD41/CD61) $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61)	800	Hepatocitos?
GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$; CD49e/CD29; VLA-5) GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; CD41/CD61)	315	Hepatocitos Fibroblastos Células endoteliales? Megacariocitos Monocitos, etc.
GPIV (CD36) GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; CD41/CD61) ? Proteína asociada a integrina (CD47)	4.900	Megacariocitos Muchas células en cultivo
GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$; CD49f/CD29; VLA-6)	-	Fibroblastos Otros tipos de células
Desconocido	-	Megacariocitos Células endoteliales

Tomado de Beutler et al., 2000.

Tabla 1.3.2. Proteínas de superficie plaquetaria

Familia del Gen	Designación común	Designación de la cadena plaquetaria	Designación de la integrina	Designación VLA	Designación CD
Integrina	Receptor del Fibrinógeno	GPIIb/IIIa	α IIb β 3		I Ib/IIIa-CD41a I Ib- CD41b IIIa-CD-61
	Receptor del colágeno	GPIa/IIa	α 2 β 1	VLA-2	Ia-CD42b IIa- CD29
	Receptor de la fibronectina	GPI*c/IIa	α 5 β 1	VLA-5	I*c-CD49e IIa- CD29
	Receptor de la laminina	GPIc/IIa	α 6 β 1	VLA-6	Ic-CD49f IIa-CD29
	Receptor de la vitronectina	α V/GPIIIa	α V β 3		α V-CD51 IIIa-CD61
Glicoproteínas ricas en leucina	Receptor del factor Von Willebrand	GPIb/IX			Ib/IX-CD42 Ib α - CD42b Ib β - CD42c IX-CD42a
		GPV			CD 42
Moléculas de adhesión celular de la familia de las	PECAM-1				CD31

inmunoglobulinas					
	Fc γ -RII				CD32
	HLA-clase I				
	ICAM-2				CD102
	GPVI				
	PAI				CD47
Selectinas	P-Selectina				CD62P
Tetraspaninas	P24				CD9
	PETA-3				CD151
	LAMP 3 (granulofisina)				CD63
Miscelánea	GPIV				CD36
	LAMP 1				CD107a
	LAMP 2				CD107b
	Receptor de la laminina de 67 kDa				
	Receptor PX1 del ADP				
	Leucosialina, sialoforina				CD43
Siete dominios transmembrana (unido a la proteína G)	PAR-1				
	PAR-4				
	Receptor del tromboxano A2				
	Receptor α 2-adrenérgico				
	Receptor de la vasopresina				
	Receptor P2Y1 del ADP				

Tabla 1.3.3. Proteínas de superficie plaquetaria

Aminoácidos	Ligandos	Específico de la plaqueta	Función
GPIIb 1039	Fib., fvw,	+	Adhesión
GPIIIa 762	Fn, Vn TSP?		agregación tráfico
GPIa 1152	Colágeno	-	Adhesión
GPIIa 778		-	
GPIc* 1008	Fn	-	Adhesión
GPIIa 778			
GPIc	Laminina	-	Adhesión
GPIIa 778			
α_v 1048	-	Adhesión?	Proteína de tráfico?
GPIIIa 762	TSP?, Osp		
GPIb α 610(7)*	Fvw, trombina	+?	Adhesión
GPIb β 181 (1)*		+?	(flujo alto)
GPIX 160 (1)*		+?	Unión a trombina?
GPV 544 (15)*		+?	
PECAM-1 738	Heparina, PECAM-1	-	Adhesión
Fc γ -RII 324	Complejos inmunes	-	Unión a complejos inmunes
HLA +	-		Histocompatibilidad
ICAM-2 274	LFA-1	-	Adhesión plaqueta-leucocito
GP VI 316	Colágeno	+	Activación
PAI 287 +	-	Activación	Activación
P-Selectina 830	Sialil-LeX LGPS-1	-	Adhesión plaqueta-leucocito
CD9 228	?	-	Activación
CD151 253	?	-	Activación
Lamp 3 238			
GPIV 471	Colágeno, TSP	-	Adhesión, transporte de

			ácidos
Lamp 1 389	?	-	?
Lamp 2 381	?	-	
67 kDa 295?	Laminina	-	Adhesión
PX1 399	ADP	-	Activación
CD43 400	ICAM-1	-	Adhesión
PAR-1 425	Trombina	-	Activación
PAR-4 385	Trombina	-	Activación
TxA2 343	PGH2/tromboxano A2	-	Activación
α 2-adrenérgico 450	Epinefrina	-	Activación
Vasopresina 418	Vasopresina	-	Activación
P2Y1 373	ADP	-	Activación

Dependiendo del lecho vascular, de las glicoproteínas de adhesión disponibles y de las condiciones del flujo, es probable que varias combinaciones de receptores plaquetarios, incluyendo GPIb α , GPIa/IIa, GPVI, p65 y GPIIb/IIIa, actúen en conjunto para formar la unión y translocación lenta de las plaquetas iniciada por la interacción del GPIb α con el fvW en una adhesión plaquetaria estable.

Tabla 1.4. Activación plaquetaria y agregación

Agonistas	Mecanismos de transducción	Efectores
Adhesión	Acido araquidónico	Activación GPIIb/IIIa
Trombina	Proteinquinasa C	Agrupamiento GPIIb/IIIa
Tromboxano A2	Tirosinquinazas	
ADP	Fosfatasas	
Epinefrina	Calcio	
Serotonina		
Vasopresina		
Trombospondina		
Factor von Willebrand		
Fibrinógeno		
FAP		
Complejos inmunes		
Plasmina		
AP-t/SQ		
Flujo		

Por lo tanto, para que tenga lugar la formación del tapón plaquetario, las plaquetas deben experimentar la activación así como la adhesión. La Tabla 1.4. enumera los agonistas plaquetarios fisiológicos y patológicos que pueden iniciar la activación plaquetaria, junto con algunas de las vías de transducción de señal que conducen a la activación de los receptores GPIIb/IIIa plaquetarios y a su agrupamiento. Los agonistas pueden clasificarse como potentes (por ej., altas dosis de trombina y colágeno) y débiles (por ej. epinefrina, ADP y serotonina) en función de su capacidad para iniciar la reacción de liberación plaquetaria, sin la estimulación adicional producto de la agregación plaquetaria. La mayoría de estos activadores son liberados o sintetizados en el lugar de la lesión vascular, dando lugar a una respuesta local. La adhesión de las plaquetas a las estructuras subendoteliales puede dar lugar, por sí misma, a la activación plaquetaria, es decir, a la generación de TxA_2 , la liberación de ADP y serotonina y la activación de los receptores GPIIb/IIIa en la cara luminal de la plaqueta. Al pasar a un estado de alta afinidad para la unión al ligando, estos mecanismos de retroalimentación positiva aseguran una respuesta hemostática adecuada. Los receptores GPIIb/IIIa lumbinales en las plaquetas adherentes pueden entonces unirse al fvW y/o al fibrinógeno y esperar a la interacción con otra plaqueta, lo que por si mismo puede desencadenar la activación de sus receptores GPIIb/IIIa como consecuencia de la exposición al ADP y TxA_2 liberado. Este proceso de unión de los ligandos adhesivos a los receptores de la plaqueta se amplifica, dando lugar al reclutamiento de capas adicionales de plaquetas y, finalmente, a la formación de un tapón hemostático.

Las plaquetas agregadas pueden facilitar la generación de trombina (Tr) mediante uno o más mecanismos diferentes, incluyendo la formación de microvesículas, la exposición del factor Va y la exposición de los fosfolípidos cargados negativamente. La Tr así generada activa más plaquetas, produciendo una degranulación mayor; también activa la coagulación e inicia el depósito de mallas de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario a la vez que sirven como lugares para más depósito de fvW. Asimismo, puede ayudar a consolidar el tapón al iniciar la retracción del coágulo mediada por plaquetas. Finalmente, la Tr afecta a los receptores de superficie de membrana, disminuyendo la expresión de GPIb/IX y aumentando la expresión de GPIIb/IIIa, probablemente facilitando la transición de la adhesión plaquetaria a la agregación plaquetaria.

La Tr procede del zimógeno inactivo, protrombina, que circula en el plasma. Forma parte del complejo protombinasa (factor Xa, factor Va, Ca²⁺), unido a las plaquetas activadas y otras células, la protombina se convierte en trombina, uno de los agonistas plaquetarios mas potentes (Pulcinelli FM et al., 1995). Por lo tanto, sus funciones principales son, activar plaquetas, clivar al fibrinógeno convirtiéndolo en fibrina y activar al factor XIII. Además, participa en la coagulación activando los factores V, VIII y XI, inhibe la coagulación activando la proteína C y atenúa la fibrinólisis activando el inhibidor de fibrinólisis activable por Tr (TAFI). Cuando se forma el coágulo, la Tr es inmovilizada sobre la fibrina, esta unión la protege de la inactivación por el complejo antitrombina-heparina (Becker et al., 1999), pero su sitio activo sigue estando accesible, como Tr unida a fibrina y es capaz de clivar fibrinógeno y activar el factor XI (dem Borne et al., 1996). También puede activar plaquetas vía los receptores de proteasa activados (PARs). PAR1 y PAR4 son receptores de moderada y baja afinidad respectivamente (Kahn ML et al., 1999). La GPIb α está descrita como receptor de alta afinidad de Tr. La GPIb consiste en dos subunidades, GPIb α y GPIb β y está expresada en plaquetas como un complejo con GPIX y GPV en una estequiometría 2:2:2:1. Existen unas 25.000 copias de GPIb α sobre la superficie plaquetaria, pero solo un pequeño número (aprox. 100 a 1000) están involucrados en la unión de alta afinidad de Tr (De Marco L et al., 1991). La Tr contiene dos sitios de unión aniónica o exositios, el exositorio I y el exositorio II, un bolsillo catalítico y un sitio de unión a Na⁺. El exositorio I es importante para la unión de múltiples sustratos, incluyendo a la fibrina y al fibrinógeno y el exositorio II es el sitio de unión a heparina (Sheehan JP et al., 1994). El bolsillo catalítico es el responsable del clivaje de los sustratos y, con el aporte del Na⁺, regula la afinidad de Tr hacia los sustratos (Di Cera E, 2003).

Las plaquetas ruedan por las células endoteliales que han sido activadas para exponer P-selectina en su superficie, y al menos uno de los receptores para la P-selectina de la célula endotelial, será la GPIb α plaquetaria. Las plaquetas también expresan en su superficie, tras la activación, el ligando CD40 que puede interaccionar con el CD40 de los linfocitos, monocitos y células endoteliales, conduciendo a la activación celular y a una respuesta inflamatoria intensificada. Luego, los trombos plaquetas-fibrina se resuelven, lo más probable, por una combinación de embolización, fibrinólisis y remoción de residuos por el macrófago. Varios factores inhibidores sirven para

equilibrar la activación plaquetaria y prevenir el depósito excesivo de plaquetas (Tabla 1.5.).

Tabla 1.5. Elementos inhibitorios fisiológicos que se oponen a la activación plaquetaria
Flujo sanguíneo
Prostaciclina (PGI ₂)
Oxido nítrico, también conocido como factor de relajación derivado del endotelio (FRDE)
CD39 de la célula endotelial (ATP difosfohidrolasa, ecto-ADPasa)
Refractariedad plaquetaria
Interacciones leucocito-plaqueta
Inhibidores de la generación y de la acción de Trombina

1.2.3.1. Metabolismo energético plaquetario

Las plaquetas tienen depósitos regulares de glucógeno que con frecuencia pueden visualizarse por microscopía electrónica. El glucógeno puede convertirse en glucosa-1-fosfato y las plaquetas también pueden tomar glucosa del medio que las rodea. Ambas fuentes de glucosa también pueden convertirse en glucosa-6-fosfato, que puede entrar en la glicólisis o en el *shunt* de la hexosa monofosfato. El metabolismo oxidativo probablemente contribuye a la producción de energía en las plaquetas en reposo, pero se ha estimado que menos del 1% del ácido pirúvico producido por la glicólisis entra, en realidad, en el ciclo del ácido cítrico y el resto termina en lactato o piruvato, que se liberan de la plaqueta. Las mitocondrias plaquetarias son capaces de llevar a cabo la β oxidación de ácidos grasos, pero no está claro cuánto contribuye a la producción de energía. (Akkerman JWN et al., 1987; Holmsen H et al., 1987)

Las plaquetas pueden metabolizar activamente acetato y esta capacidad ha sido explotada para mejorar las condiciones del almacenamiento plaquetario. Los aminoácidos también pueden actuar como fuente de energía y mantener el ciclo del ácido cítrico, pero la contribución de este proceso en el metabolismo energético plaquetario es incierto.

Como en todas las células, el consumo de ATP por parte de las plaquetas está parcialmente dedicado al mantenimiento de la homeostasis iónica y osmótica. Además, la polimerización y depolimerización continua de la actina implica la conversión de ATP a ADP, lo que puede explicar hasta el 40% del consumo de ATP en las plaquetas

en reposo. Los inositol fosfatos, importantes en las señales de transducción, sufren una desfosforilación y refosforilación continua; se ha estimado que estas reacciones consumen hasta un 7% del total de ATP producido (Verhoeven AJM et al., 1987).

La estimulación plaquetaria va acompañado por un aumento marcado en la actividad glicolítica y en la producción oxidativa de ATP, quizá debido a la disminución brusca de ATP que tiene lugar con la activación plaquetaria o el aumento en el pH citoplasmático (Akkerman JWN et al., 1987).

1.2.3.2. Elementos contráctiles plaquetarios, cambio de forma, secreción y retracción del coágulo.

Los principales componentes del sistema contráctil plaquetario están enumerados en la Tabla 1.6. Se piensa que estos elementos contribuyen al cambio de forma de la plaqueta, a la secreción y a la retracción del coágulo después de la activación plaquetaria.

Tabla 1.6. Proteínas del citoesqueleto plaquetario

Proteína	Propiedades	Proteína	Propiedades
Actina	<p>PM = 42 kDa</p> <p>20%-30% del total de la proteína plaquetaria</p> <p>Actina monomérica (G-actina) unida al calcio-ATP (o ADP)</p> <p>La polimerización requiere energía (ATP-ADP) y produce F-actina</p> <p>Filamentos de F-actina: dos hebras de hélices entrelazadas con polaridad basada en la capacidad para interactuar con el fragmento de miosina (extremos “en punta” y “espiculados”) Polimerización constante: pérdida de monómeros del extremo puntiagudo mientras otros se unen al extremo espiculado (“fabricación en serie”)</p>	Talina	<p>PM = 235 kDa</p> <p>3% de la proteína plaquetaria</p> <p>Se une a la vinculina, α-actinina y quizá, a los receptores de las integrinas y a la actina α</p>
Profilina	<p>PM = 15.2 kDa</p> <p>Forma complejos 1:1 reversibles con el monómero de actina</p> <p>Previene la polimerización de la actina</p> <p>Puede ayudar a “recargar” los monómeros de actina de ATP</p>	A-Actinina	<p>PM = 100 y 102 kDa; dímero</p> <p>Se une a la actina con una estequiometría de 1:10; se une al Ca^{2+}</p> <p>Forma un gel con la F-actina; coopera con la proteína de unión a la actina; promueve la polimerización de la actina</p>
Gelsolina	<p>PM = 91 kDa</p> <p>Se une al extremo espiculado de los filamentos de F-actina</p> <p>Separa los filamentos de actina</p> <p>Facilita la nucleación</p> <p>Produce filamentos mas cortos con transformación gel-sol</p>	Vinculina	
Timosina β_4	<p>PM = 5 kDa</p> <p>Se une al monómero de actina</p> <p>Inhibe la polimerización de la actina</p>	Miosina II	<p>PM = 130 kDa</p> <p>Se une a la talina; puede unir a la actina a las proteínas de membrana en los lugares de adhesión</p>
Tropomiosina		Quinasa de la cadena ligera	<p>PM = 480 kDa (2 x 200; 2 x 200; 2 x 16)</p> <p>2%-5% de la proteína plaquetaria; filamentos de 325 x 111 nm</p> <p>Cadena ligera de la miosina (PM = 20 kDa); fosforilada; requerida para la actividad ATPasa</p>
		Calmodulina	<p>PM = 105 kDa</p> <p>Fosforila la cadena ligera</p>

<p>Caldesmón</p>	<p>PM = 28 kDa; dímero en forma de vara de 35 nm de longitud Se une a la ranura de los filamentos de actina 8 seis actinas: una tropomiosina) No todos los filamentos de actina tienen una tropomiosina unida</p>	<p>Cap Z</p>	<p>de miosina y activa la ATPasa de la miosina de la actomiosina dando lugar a la contracción</p>
<p>Proteína de unión a la actina (Filamina 1)</p>	<p>PM = 80 kDa, asimétrica Se une a la actina, tropomiosina, miosina y calmodulina Puede controlar el empaquetamiento del filamento de actina y la actomiosina ATPasa</p> <p>PM = 260 kDa la subunidad; dímero; vara elongada, flexible de 162 nm; fosforilado 2%-3% de la proteína plaquetaria Se une a la actina con una molécula de proteína de unión a la actina por 174 moléculas de actina Se une al dominio citoplasmático de GPIIb y une GPIIb/IX a la actina Entrecruza los filamentos de actina para formar un gel La desfosforilación conduce a la pérdida de la actividad</p>	<p>Cofilina</p> <p>Fimbrina (L' plastin)</p> <p>VASP</p> <p>GTPasas</p> <p>Tirosinquinazas</p> <p>Proteínas adaptadoras</p> <p>PI quinazas</p>	<p>PM = 17 kDa Une cuatro moléculas de calcio y activa la quinasa de la cadena ligera de miosina</p> <p>PM = 36 y 32 kDa Heterodímero Se une a los extremos espiculados de los filamentos de actina</p> <p>PM = 20 kDa Acelera la polimerización de los filamentos de actina</p> <p>PM = 68 kDa Envuelve los filamentos de actina</p> <p>PM = 50 kDa Tetramérico Se une a la profilina, vinculina y zyxina</p> <p>Cdc42-filopodios Rho-fibras de estrés Rac- Rap 1b-control de GPIIb/IIIa</p> <p>Pp60 Pp125-señalización de GPIIb/IIIa</p>

			14-3-3 Φ -unida a GPIb α Pleckstrina-fosforilada durante la activación PI-3 quinasa PI ₄ P-5 quinasa
--	--	--	---

1.2.3.3. Cambios anatómicos en las plaquetas activadas

En respuesta a la activación, las plaquetas tienen marcadas alteraciones físicas que sin embargo preservan la integridad del glucocálix. Esto permite que los receptores en él interactúen con los ligando correspondientes en los procesos de adhesión y activación. La primera alteración visible producida es el **cambio de forma**, promovida por la reestructuración del citoesqueleto plaquetario, que comienza con la pérdida de la forma discoide de las plaquetas, las cuales devienen más redondeadas y empiezan a emitir pseudópodos y se extienden sobre la superficie expuesta (spreading) aumentando de forma considerable su área de contacto con ella y con las demás plaquetas. Parece ser que los movimientos del SCA sobre la superficie plaquetaria contribuyen a estas alteraciones. Al mismo tiempo, los orgánulos intraplaquetarios, que estaban dispersos por el citoplasma, van siendo desplazados hacia el centro celular por la contracción del anillo de microtúbulos y los microfilamentos.

Estos cambios anatómicos favorecen la secreción o exocitosis en que los gránulos plaquetarios y los lisosomas liberan sus compuestos en las cavidades del SCA que, al mismo tiempo se dilatan. Cuando el contenido plaquetario ya ha sido secretado, los restos del citoesqueleto forman una masa central del gel contráctil, persistiendo algunos microtúbulos retorcidos o aplastados, principalmente en los pseudópodos. El mecanismo principal de la secreción es la fusión de los gránulos individuales con la membrana del SCA y la ulterior extrusión de las sustancias a través de los poros que comunican el SCA con el exterior.

Bajo determinados estímulos, las plaquetas activadas liberan también elementos formes o partículas de tamaño muy pequeño (Heijnen HF et al, 1999). Entre ellas cabe distinguir las microvesículas o micropartículas, de forma esférica y de diámetro de 0,1 y 1 μ m, generadas por emisión de evaginaciones vesiculares a partir de la membrana

celular que se van estrechando por su base hasta que se desprenden. Contienen proteínas plaquetarias y, también de la membrana de los gránulos α (P-selectina), además de componentes del citoesqueleto. La emisión de micropartículas se ha relacionado con un aumento de la actividad procoagulante plaquetaria. Otro tipo de estructuras liberadas durante la secreción son los llamados exosomas, de tamaño mucho más pequeño, entre 40 y 100 nm y morfología idéntica a las vesículas del interior de los (cuerpos multivesiculares) CMV y gránulos α . Los exosomas contienen selectivamente CD63 y se ha sugerido que podrían tener una función similar a la de los CMV, en el espacio extracelular. (Escolar G et al ., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Generales y Específicos

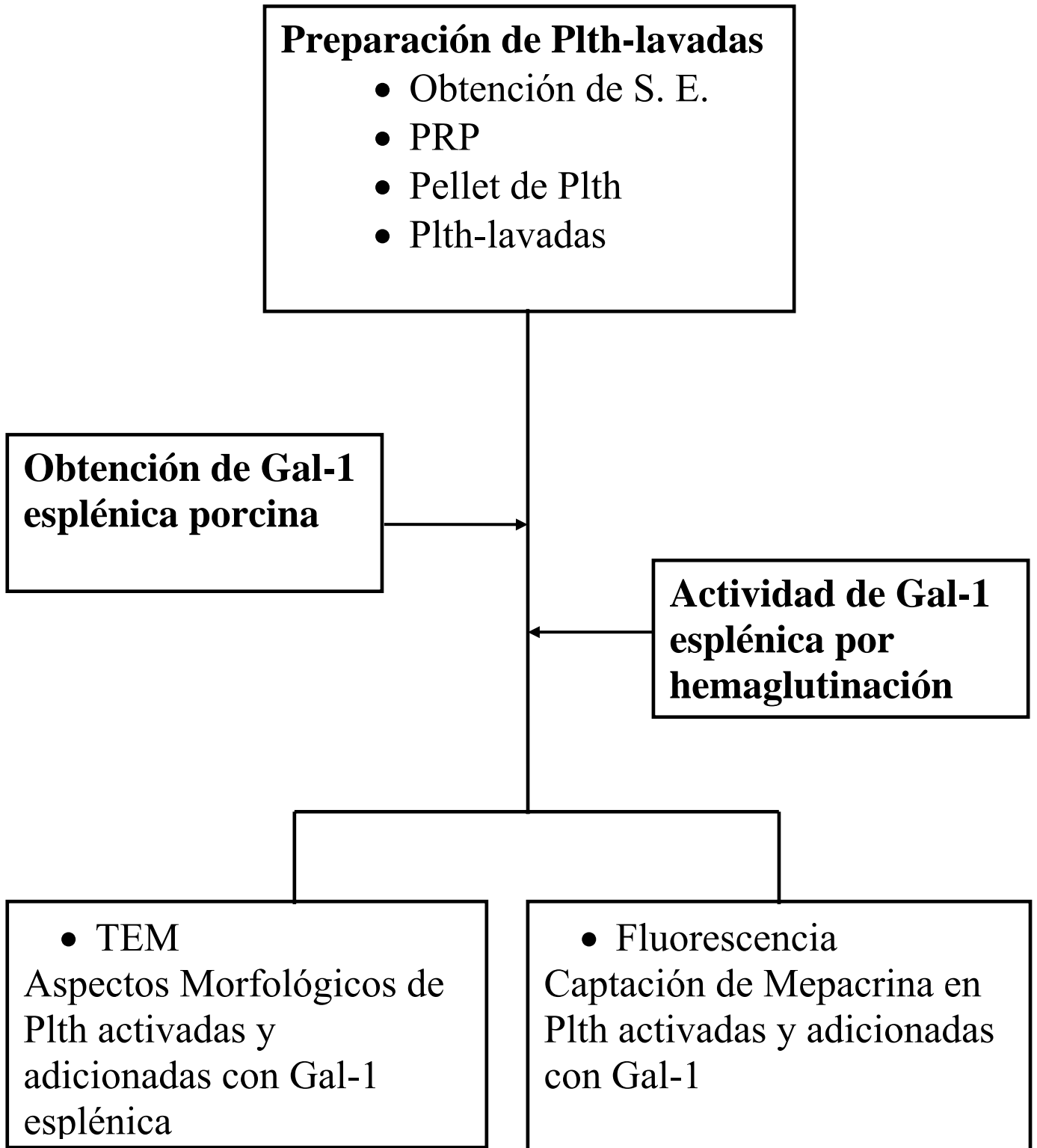
2.1.1. Objetivo General

Analizar los cambios en las plaquetas humanas en reposo o activadas y adicionadas con Gal-1, por microscopía electrónica de transmisión y fluorescencia

2.1.2. Objetivos Específicos

- a) Obtención, caracterización y actividad de Gal-1 esplénica porcina como reactivo de trabajo.
- b) Realizar estudios de cambios ultraestructurales por microscopía electrónica de transmisión en plaquetas lavadas, en reposo, activadas con trombina, y adicionadas con Gal-1 en diferentes concentraciones.
- c) Estudio de captación de Mepacrina en Pth1 en reposo, activadas con Tr y adicionadas con Gal-1

3. ESQUEMA DE TRABAJO



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de Gal-1 esplénica porcina

4.1.1. Animales utilizados

Se utilizaron bazos enteros a partir de hembras adultas y lechones de 6 meses de edad, de aproximadamente 10 kg de peso, de la raza *Sus scrofa*, los cuales se adquirieron al momento del sacrificio en frigoríficos locales. Los órganos previa eliminación de tejido graso, se congelaron a -20°C hasta el momento de su uso.

4.1.2. Obtención de homogenatos de bazo

Se procesaron bazos porcinos de acuerdo a lo descrito por Elola y Fink (1997). La homogenización del tejido se efectuó en buffer MEPBS (75 mM ClNa, 75 mM $\text{PO}_4\text{HNa}_2/\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 4 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7,2) 1:10, conteniendo lactosa 300 mM (1,6 g de tejido/ml de buffer). Los extractos solubles se obtuvieron por centrifugación a 900 xg durante 60 min, a 4°C , se filtró por gasa y se centrifugó nuevamente a 1800 x g. Se recuperaron los sobrenadantes para efectuar una purificación adicional de la galectina.

4.1.3. Purificación de la galectina-1 esplénica

4.1.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones citosólicas que se obtuvieron después de centrifugar, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE-Sepharosa CL-6B como intercambiador aniónico, equilibrado previamente en MEPBS 1:10. Se dejó una noche en agitación; luego se lavó con MEPBS 1:10 para eliminar los materiales no unidos y se eluyó con MEPBS 1:10, ClNa 500 mM. Las fracciones eluidas de la resina de intercambio aniónico entraron luego en cromatografía de afinidad (Ahmed H et al., 1994).

4.1.3.2. Cromatografía de afinidad

Los eluatos de DEAE-Sepharosa se sembraron en columnas de 50 ml de lactosa-agarosa, equilibradas con MEPBS 1:10-ClNa 500 mM. Una vez lavado el material no unido específicamente, primero con 6 veces el volumen de Sepharosa

(aproximadamente 300 ml) de MEPBS 1:10-CINa 500 mM y luego con 300 ml de MEPBS 1:10; la proteína ligada se eluyó con lactosa 100 mM en MEPBS. El contenido proteico de cada fracción eluída se midió por el método de Bradford descrito en el inciso 4.1.3.3.

4.1.3.3. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

La concentración proteica de los extractos crudos y de las lectinas purificadas se determinaron mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976), utilizando albúmina sérica bovina (MERK) como estándar. Se utilizó reactivo comercial Biorad (Tabla 4.1.1.) o reactivo propio puesto a punto utilizando el micrométodo de Bradford (Tabla 4.1.2.).

El reactivo de Bradford propio se preparó disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en una mezcla de 100 ml de ácido fosfórico 85% y 50 ml de etanol 95%, luego de la completa disolución del colorante se llevó a 1L con agua destilada. Se filtró antes de ser utilizado.

Los ensayos para la determinación de la concentración proteica de los extractos crudos y purificados de la Gal-1, se efectuaron incubando la muestra o la proteína estándar según las relaciones volumétricas y condiciones experimentales que se detallan en la Tabla 4.1.1. o en la Tabla 4.1.2., para cinco diluciones de la albúmina y de la muestra de concentración desconocida. La longitud de onda utilizada para la lectura en cada tubo fué a 595 nm y las concentraciones desconocidas se calcularon de acuerdo a la pendiente de la curva estándar según la siguiente relación:

$$\text{Concentración incógnita} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Factor}}$$

Factor

Tabla 4.1.1. Protocolo para la determinación del contenido proteico utilizando el reactivo de Bradford comercial Biorad

	Curva estándar					Muestra
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	
Albúmina (μl)*	(blanco)	5	10	15	20	0
MEBPS-lactosa (100 mM) (μl)	800	795	790	785	780	400
Extracto crudo o Gal-1 (μl)	0	0	0	0	0	400
Reactivo de Bradford (μl)	200	200	200	200	200	200

*La concentración de la solución estándar de albúmina empleada en este ensayo fue de 1.00 mg/ml.

Incubación: 15 minutos a t.a.

Tabla 4.1.2. Protocolo para la determinación del contenido proteico utilizando el reactivo de Bradford propio.

Micro método

	Curva estándar					Muestra
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	
Albúmina (μl)*	(blanco)	10	50	75	100	0
MEBPS (μl)	100	90	50	25	0	0
Extracto crudo o Gal-1 (μl)	0	0	0	0	0	100
Reactivo de Bradford (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

*La concentración de la solución estándar de albúmina empleada en este ensayo fue de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Incubación: 15 minutos a t.a.

4.1.3.4. Almacenamiento de la Gal-1 purificada

a). En columnas de intercambio aniónico

Se procedió a la siembra en columnas de DEAE preparadas en jeringa de plástico de 5 ml, sobre un piso de lana de vidrio se colocó 1ml de DEAE. Se equilibró la columna con MEPBS 1/10 y luego se sembró el eluido de la columna de afinidad lentamente sobre la pequeña columna y se cubrió con una solución al 50% de glicerol en MEPBS 1/10, luego se cerró la columna y se la conservó a -20°C.

Para eluir la proteína de la minicolumna se lavó con MEPBS 1/10 para eliminar la lactosa y se eluyó con pequeños volúmenes de MEPBS-CINa 500 mM y luego se midió la cantidad de proteína con la técnica de Bradford.

b). Liofilizada

El eluido de la columna de lactosa-agarosa (columna de afinidad) se dializó frente a buffer MEPBS1/10-Mercaptoetanol, se fraccionó y las alícuotas se liofilizaron, conservándolas a -20 °C.

4.2. Caracterización bioquímica parcial de la Gal-1 esplénica porcina

4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se efectuó la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes, o sea en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1%, según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) a los efectos de evaluar el grado de pureza de las muestras obtenidas y el peso molecular de la subunidad proteica de las galectinas en estudio.

Se utilizaron geles de un porcentaje de acrilamida de 12% y un espesor de 0,75 mm. Las muestras se desnaturizaron por calentamiento a 100°C en buffer de muestra con SDS 2% y mercaptoetanol durante 90 segundos. Se sembraron de 5 a 15 µl de la muestra en cada calle. La muestra se obtuvo del DEAE conservado a -20°C; primero se lavó el mismo con 10 ml MEPBS 1/10 y luego se eluyó con 200 µl de MEPBS -CINa 500 mM, o del liofilizado conservado a -20°C, reconstituido con solución fisiológica.

El estándar de PM utilizado fue: Dalton Mark VII-L (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, Estados Unidos): BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor del tripsinógeno (20,1 kDa) y lactoalbúmina (14,2 kDa).

Las corridas se efectuaron a 1 mA por muestra (10 mA/gel con diez siembras), mientras las proteínas atravesaban la zona del gel de empaquetamiento (“stacking”); cuando las muestras pasaron al gel de resolución, la intensidad de la corriente se incrementó al doble. Se trabajó a 10°C, usando azul de bromofenol para visualizar el frente de corrida.

Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue o con coloración argéntica dependiendo de la concentración de proteína presente en la banda.

Tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue: se tiñeron a t.a. con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.125% en una solución de metanol 50% y ácido acético 10%, siendo desteñidos en metanol 2%-ácido acético 7%.

Tinción de los geles con coloración argéntica: coloración mejorada para proteínas vegetales, ADN y ARN en geles de PAGE (Blum et al., 1987). El método se basa en dos propiedades químicas del $S_2O_3^{2-}$: mejoramiento de la imagen por pretratamiento de geles fijados y formación de complejos solubles de Ag que eliminan el background inespecífico (coprecipitación de sales insolubles de Ag) durante el desarrollo de la imagen.

Se fija con 100 ml de solución fijadora (metanol 50 ml, ácido acético 12 ml, formaldehído 37% 50µl, H₂O c.s.p. 100 ml) durante 1 hora o una noche para prevenir difusión de proteínas y disminuir fondo. Se lava tres veces (20 minutos cada una) con solución de lavado (etanol 30%) para remover el ácido acético. Se trata con solución de pretratamiento ($S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ 0,03 g, H₂O desionizada c.s.p. 150ml) durante 1 minuto exacto. Se lava tres veces con agua bidestilada durante 20 segundos cada vez para remover el exceso de $S_2O_3^{2-}$. Luego se trata con solución de Ag (NO_3Ag 0,2g, formaldehído 37% 75µl, H₂O desionizada csp 100 ml) durante 20 minutos. Se lava con agua bidestilada 2 veces durante 20 segundos cada una para remover el exceso de NO_3Ag , el cual podría consumir el $S_2O_3^{2-}$ del paso siguiente. Se sumerge el gel en la solución de desarrollo (Na_2CO_3 6 g, solución de pretratamiento 1 ml, formaldehído

37% 50 µl, agua desionizada csp 100 ml) hasta que no aparezcan más bandas durante aproximadamente 2 minutos; la reacción se detiene sumergiendo el gel en una solución que contiene: metanol 10 ml, ácido acético 12 ml, agua desionizada csp 100 ml, durante 10 minutos.

4.2.2. Immunoblotting

Se efectuó la transferencia electroforética de los geles de PAGE-SDS. Estos geles se sometieron a Western blot en membranas de nitrocelulosa a 0,45 µm en Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8,3 (buffer Towbin), durante 1 h. Las membranas se bloquearon en leche 5%-PBS-Tween 20 0,05% durante 1 h a t.a. y en agitación. Se incubó con el primer anticuerpo antigalectina esplénico porcino diluido 1/100 en PBS Tween 20 durante 1 h a t.a. Se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS-Tween 20 0,05% y se incubó con el suero anti-IgG de conejo obtenido en oveja conjugada con peroxidasa (segundo anticuerpo, Sigma) en una dilución 1:1000 en PBS-Tween 20 0,05%, durante 1 h a t.a. Finalmente, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS y se desarrolló con 4-cloro-1-naftol disuelto en metanol y con H₂O₂ 30% en buffer Tris-salina (Tris 20 mM, ClNa 500 mM, pH 7,5) durante 2-10 min, las membranas se lavaron varias veces con agua destilada para detener la reacción y se secaron al aire.

4.2.3. Determinación de la actividad lectínica hemoaglutinante

4.2.3.1. Preparación de suspensiones globulares desializadas

Se obtuvieron glóbulos rojos de conejo (GRC) tratados con neuraminidasa (sialidasa) y fijados con glutaraldehído (GRCD) (Joubert et al., 1986). Para ello, los GRC se lavaron tres veces en SF y luego se desializaron con neuraminidasa Sigma de *Clostridium perfringens* (0.06 UI/ml de pellet globular), durante 90 min a 37°C, en agitación periódica. Luego, los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato-salina (PBS: PO₄H₂K/PO₄HK₂ 150mM-ClNa 150 mM, pH 7.2) y se fijaron en glutaraldehído fresco al 1% durante 1 h, a temperatura ambiente (t.a.) y en agitación periódica. La fijación se terminó mediante cuatro lavados en glicina 0.1 M en PBS, efectuando luego cuatro lavados en PBS. Los GRCD se conservaron a 4°C como suspensiones al 1% (v/v) en

CINa 150 mM conteniendo azida sódica 1 %, hasta tanto no se obtuviesen reacciones falso positivas.

4.2.3.2. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante

La cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la lectina pura, se llevó a cabo en microplacas en U, utilizando GRCD preparados como se indicó en la sección 4.2.3.1. Cada pocillo de la placa fue sembrado con 20 μ l de cada dilución de los extractos preparada en CINa 150 mM, 20 μ l de CINa 150mM, 20 μ l de albúmina sérica bovina al 1% en CINa 150 mM , 20 μ l de la suspensión de GRCD al 5%. Se incubó 3h a t.a. Se efectuaron controles de GRCD incubados en ausencia de muestra. La lectura se hizo macroscópicamente en base a considerar como resultado negativo la formación de un botón en el fondo del pocillo de la placa, y como resultado positivo la formación de un manto uniforme de la suspensión globular, ocupando toda la superficie del pocillo.

La mayor dilución de una muestra que presentó hemoaglutinación positiva se consideró que poseía una *unidad hemoaglutinante* (1 UH). El *título* (T) de cada extracto se expresó como la inversa de la dilución que resultó ser el punto final. La actividad específica se definió como el número de UH/mg de proteína soluble.

4.3. Preparación de plaquetas humanas lavadas (Pthl) para realizar los ensayos de ultraestructura mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y fluorescencia (F)

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de (n= 10) personas sin diferenciación de sexo, de edades comprendidas entre 25 -60 años, aparentemente sanas y con el consentimiento informado, conforme a los criterios bioéticos para las investigaciones en humanos. Se recolectaron por punción venosa, directamente en tubos plásticos 10 ml de sangre, que contenían anticoagulante (citrato de sodio 3,8 g% 9:1) .

Se centrifugó la sangre entera con citrato a 200 rpm durante 5 a 7 min. Se separó el plasma rico en plaquetas de las 2/3 partes superiores. Luego se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min, para obtener el plasma pobre en plaquetas. El mismo debe estar libre de Plth por ello es importante evaluar la ausencia de plaquetas con un contador automatizado. Al pellet de plaquetas se le agregó solución salina hipotónica (CINH4

1%) 5 min. a ta, para eliminar el resto de glóbulos rojos. Luego se realizaron tres lavados con búffer Tris HCl 0,01 M, EDTA 1 M, NaCl 0,15 M, glucosa 5 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4. El tercer lavado se realiza con buffer sin EDTA. Las plaquetas lavadas se resuspendieron a una concentración de $1 \times 10^{11}/L$ en PBS para los ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y a una concentración de $8 \times 10^{11}/L$ en búffer de lavado Tris HCl 0.01M sin EDTA para ensayos de Fluorescencia.

4.4. Estudio de ultraestructura en Pthl activadas y adicionadas con Gal-1 esplénica

Se colocan a 37 °C los tubos Eppendorf, con 50 μ l de la suspensión de Pthl ($6 \times 10^{11}/L$) en reposo o activadas (Pthl) con 50 μ l de trombina Tr, aproximadamente 0.2U/ml de acuerdo al inserto del fabricante (Lab. Wiener, Rosario, Argentina) entre 15 seg. ,30 seg. y 1 min. Posteriormente se incubaron 30 min. con 50 μ l de Gal-1 esplénica porcina, a diferentes concentraciones (0.5 μ M, 0.3 μ M y 0,1 μ M). También se incubaron Pthl en reposo con Gal-1 a una concentración de (0.5 μ M) inhibida previamente con lactosa (100mM) 30 min a ta. (Gal-1 In). Se lavaron dos veces con PBS, centrifugando luego de cada lavado a 400 xg durante 7 min. En el último lavado se dejó el botón plaquetario en el fondo del tubo.

Durante la preparación de Plaquetas para el ensayo de microscopia electrónica de transmisión TEM, se llevaron a cabo recuentos después de cada lavado, y así corroborar que se contaba con una buena concentración de plaquetas hasta el final del ensayo.

4.5. Preparación de Pthl para microscopía electrónica de transmisión

Una vez que se llevó a cabo todas las etapas de la preparación de las plaquetas lavadas, tratadas y controles, se procedió a la fijación con una solución de (glutaraldehido 4% en búffer 0,1 M fosfato pH 7,4) durante 2 horas a 4°C. Luego se lavó 3 o 4 veces con el mismo búffer. Esta preparación se osmolizó con 5% de sacarosa. Se hizo una segunda fijación con OSO4 (tetróxido de osmio) al 1% en búffer fosfato durante 1 h a 4°C. Se lavó con agua destilada o búffer 3 veces, siendo cada lavado de 5 min. La deshidratación se hizo en alcohol de 50% al 70% durante 5 min. en cada fase a la misma temperatura y en alcohol absoluto en tres ocasiones, 10 min., a t.a. La inclusión se

realizó en resina epoxi o araldita. Los cortes ultrafinos fueron de 60 nm de espesor y se obtuvieron mediante un Ultramicrotomo Super Nova Reichert-J. Luego se montaron sobre grillas de cobre cubiertas de una membrana de colodión y se contrastaron con araldita y citrato de plomo, se examinaron y fotografiaron en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEM 1200 EX II. Los cortes semifinos para control del material mediante Microscopio óptico (M.O.) fueron de 2 micras de espesor y contrastados con azul de Toluidina. (Tabla 4.2.1.)

Tabla 4.2.1. Protocolo de ensayos para el estudio de la ultraestructura por TEM en Pthl activadas y adicionadas con Gal-1 esplénica.

Tubo	Reactivo/ Método	Pth l.	Act/ Tr 0,2U/ml	Lavado	Gal- 1C	Incubación	Fijado	Lavado
1	ctrl. 3	●		●		37°C 30 min Lavar 3 veces con PBS 4°C	Glutaral- dehido al 2% 2 hs 4°C	●
2	Gal-1 0,5 µl	●		3 lav.	●			3 lav.
3	Gal-1 0,3 µl	●		Con	●			Con
4	Gal-1 0,1 µl	●		PBS	●			PBS
5	Gal-1 0,1 µl inh.	●		centrifugar	●			sucrosa
6	Act. Tr 15 seg. Gal-1 0,5µl	●	●	c/ lavado 10 min.	●			Centrifugar c/ lavado 30 min.
7	Act. Tr 30 seg Gal-1 0,5µl	●	●					
8	Act. Tr 1 min Gal-1 0,5µl	●	●					
9	ctrl. 2	●		●				
10	ctrl. 1	●						
Etapas realizadas en eppendorf								

4.5.1. Preparación de Pthl para estudios de fluorescencia

Se realizaron experimentos por triplicado para cada dador (n=6). En tubo con 50 µl de suspensión de Pthl ($8 \times 10^{11}/L$). Luego se incubó con Mepacrina (Quinacrine Sigma Aldrich, St Louis Mo.) 0,2 mM por 20 minutos a 37°C en cámara oscura. Nuevamente se lavó 2 veces más con Tris-HCl 0,01M sin EDTA y con Tris-HCl sin EDTA con Prostaglandina respectivamente (Alprostadil 25000 MCG, Roma-Farmacia y Laboratorio S.A. Capital Federal Argentina) centrifugando en cada lavado a 560 xg durante 10 min. Las (Pthl) fueron activadas con 50 µl de trombina Tr, aproximadamente 0.2 U/ml de acuerdo al inserto del fabricante (Lab. Wiener. Rosario. Argentina) entre 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto y 2 minutos a 37 °C. Posteriormente se incubaron 30 min. con 50 µl de Gal-1 esplénica porcina, concentración subóptima (0.1µM) determinada en ensayos previos. También se incubaron Pthl en reposo con Gal-1 a una concentración (0.1µM) inhibida previamente con lactosa (100 mM) durante 30 min a ta. (Gal-1 Inh). Simultáneamente se realizó un control de Pthl en reposo lavadas con Tris-HCl sin EDTA con Prostaglandina. Se lavaron 2 veces más con Tris-HCl 0,01M sin EDTA y con Tris-HCl sin EDTA con. Prostaglandina respectivamente, centrifugando en cada lavado a 560 xg durante 10 min. Se observó entre porta y cubreobjetos en el microscopio de epifluorescencia NIKON ECLIPSE E 400, realizando luego la toma de fotografías con una cámara NIKON COOLPIX 4500-JAPAN. También se observó en un microscopio invertido de fluorescencia Leica LMD 6000 Alemania, con cámara incorporada modelo Eclipse TI-U de NIKON, con un sistema de EPI-Fluorescencia. JAPAN. (Tabla 4.2.2.)

Tabla 4.2.2. Protocolo de ensayos para Fluorescencia de captación de Mepacrina en Pthl en reposo activadas y adicionadas con Gal-1 y Gal-1 Inh.

Tubo	Reactivo/ Método	Pthl lavadas	Mepacrina 0,2 mM	Incubación	Pthl Act. Tr 0,2 U/ml	Lavados	Gal- 1C 0,1µM	Incubación	Suspensión de Pthl tratadas 150µl
1	ctrl.	●	●	37°C 20 min. Cámara Oscura Lavar 2 veces con Tris HCl Sin EDTA Centri- fugar c/lavado 5 min	●	Lavar 2 veces con Tris HCl Sin EDTA Centri- fugar c/lavado 5 min	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	t. a . 30 min.	●
2	Tr. 15 seg.	●	●		●			●	
3	Tr. 30 seg.	●	●		●			●	
4	Tr. 1 min	●	●		●			●	
5	Tr. 2 min.	●	●		●			●	
6	Gal-1C	●	●		●			●	
7	Gal-1C Inh.	●	●		●			●	
8	Tr. 15 seg.	●	●		●			●	
9	Tr. 30 seg	●	●		●			●	
10	Tr. 1min	●	●		●			●	
11	Tr. 2 min	●	●		●			●	
12	Con Prostagl.	●	●		●			●	
Etapas realizadas en tubo									Etapa realizada en portaobjetos

5. RESULTADOS

5.1. Determinación del contenido proteico de la Gal-1 esplénica porcina, por el método de Bradford

Se realizó una curva de calibración con albúmina bovina estándar para cada medición proteica de los extractos crudos y de la Gal-1 obtenida en cada purificación. Mediante su ajuste a una curva de regresión lineal se determinó la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de la Gal-1 purificada, expresándose luego en concentración μM . Las concentraciones de Gal-1 obtenida en sucesivas purificaciones realizadas a lo largo de este trabajo, estuvieron comprendidas entre: 10-60 μM .

Se utilizaron dos reactivos de Bradford, el reactivo comercial (Tabla 5.1.1; Fig. 5.1.1.) y el reactivo de preparación propia (Tabla 5.1.2.; Fig. 5.1.2.), a continuación presentamos las curvas de calibración obtenidas para la determinación proteica de solo una purificación de todas las realizadas.

a). Reactivo comercial (Biorad)

Tabla 5.1.1. Curva de calibración del reactivo comercial

Conc. Alb.($\mu\text{g/ml}$)	Abs. (595nm)
0	0
6.3	0.420
12.5	0.639
18.8	0.778
25.0	1.115
$r=0.9850$ $A=0.072$ $B=0.041$	

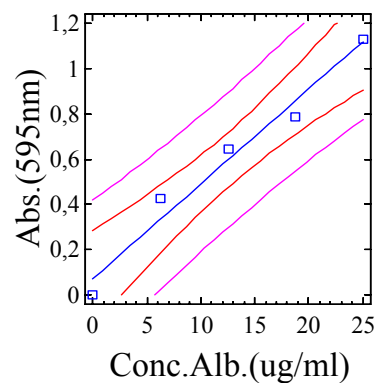


Figura 5.1.1. Regresión lineal de la curva de calibración del reactivo comercial

b) Reactivo de preparación propia

Tabla 5.1.2. Curva de calibración del reactivo de preparación propia

Conc. Alb.($\mu\text{g/ml}$)	Abs. (595nm)
0	0
10	0.081
50	0.309
75	0.461
100	0.632
$r = 0.9993$ $A = 6.39 \times 10^{-3}$ $B = 6.17 \times 10^{-3}$	

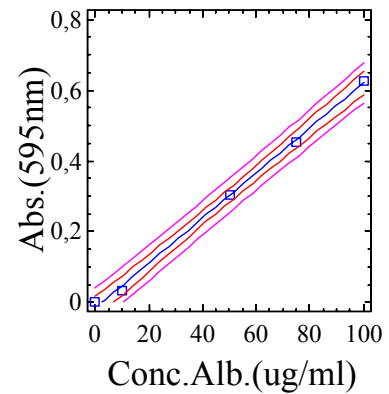


Figura 5.1.2 Regresión lineal de la curva de calibración del reactivo de preparación propia

5.2. Caracterización bioquímica parcial de la Gal-1 esplénica porcina

5.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó la corrida electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de marcadores de PM y de la Gal-1 esplénica porcina de varias purificaciones (Fig.5.2)

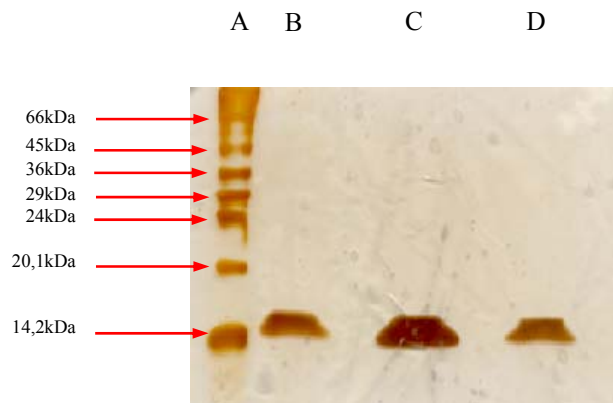


Figura 5.2. SDS-PAGE de Gal-1 en condiciones desnaturizantes. A) Los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas: albúmina bovina (66kDa), ovoalbúmina (45kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36kDa), anhidrasa carbónica (29kDa), tripsinógeno (24kDa), inhibidor del

tripsinógeno (20,1kDa) y α -lactoalbúmina (14,2kDa). B), C) Y D) Distintas purificaciones de Gal-1. Revelado con coloración argéntica.

5.2.2. Inmunoblotting

Se transfirieron los geles de SDS-PAGE de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.2. En la Fig. 5.3 se muestran los resultados obtenidos en el *immunoblotting* de la Gal-1 donde se observa una banda de 14.5 kDa, en las tres purificaciones.

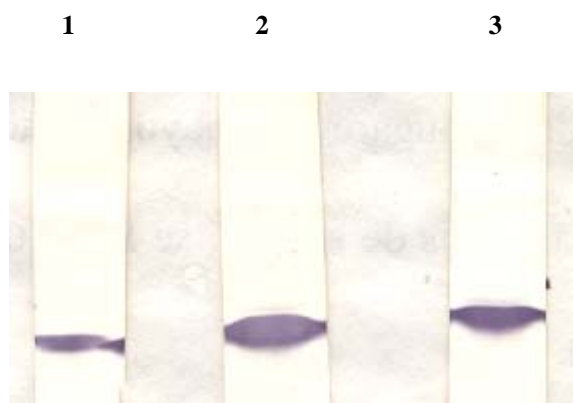


Figura 5.3. Inmunoblotting de Gal-1 provenientes de purificaciones diferentes: 1, 2 y 3. Los geles de SDS-PAGE fueron transferidos a nitrocelulosa e incubados con anticuerpo policlonal anti-Gal-1 esplénico porcino (Dil.= 1/100), y como 2° anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato.

5.2.3. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante

La cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la lectina purificada, se llevó a cabo en microplacas en U, utilizando GRCD preparados como se indicó en la sección (4.2.3.1.). Se efectuó un control negativo con GRCD incubados en ausencia de la muestra. La lectura de la placa se llevó a cabo de acuerdo al criterio descrito en la sección (4.2.3.2.)

Se determinó el título (T) de la Gal-1, y la actividad específica (UH/mg de proteína soluble). A modo de ejemplo; en la Fig.5.4 se muestra la determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de una de las lectinas purificada.

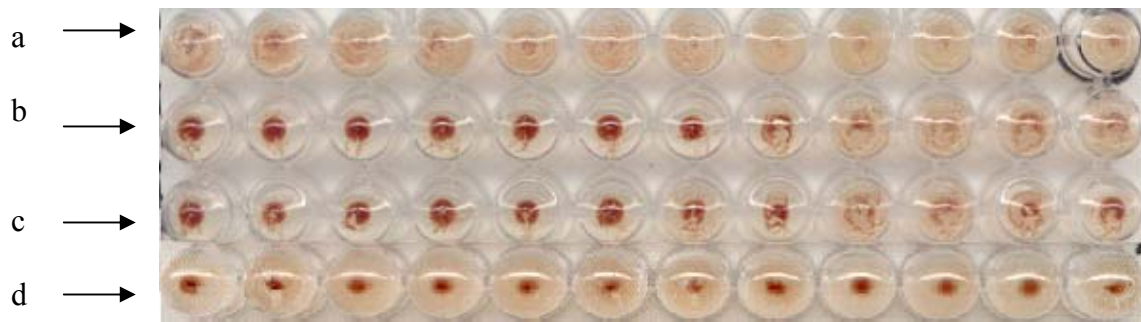


Figura 5.4 a) Control positivo (Gal-1 recombinante humana); b) y c) Cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 esplénica porcina purificada en microplaca en U, incubando los GRCD con diluciones crecientes de la lectina, de derecha a izquierda; d) Control negativo: GRCD incubados en ausencia de Gal-1. Concentración de Gal-1 empleada: 32 $\mu\text{g/ml}$. Actividad específica: 19.047 UH/mg.

Por consiguiente, se purificó y caracterizó la Gal-1 esplénica porcina, para después ser empleada en los estudios de interacción de la lectina con las plaquetas. En la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se obtuvo una banda de 14 kDa, que corresponde al homodímero de Gal-1. Luego por estudios inmunológicos (immunoblotting) con antisuero anti-Gal-1 de bazo porcino obtenido en conejo, se confirmó la presencia de una banda y finalmente, se realizó la medida de la actividad lectínica hemoaglutinante (Ahmed H et al., 1996; Elola MT et al., 2005).

Por lo tanto, una vez asegurada la pureza y actividad biológica de la lectina, se procedió a investigar la influencia de la Gal-1 sobre las plaquetas humanas.

5.3. Control de las Pthl

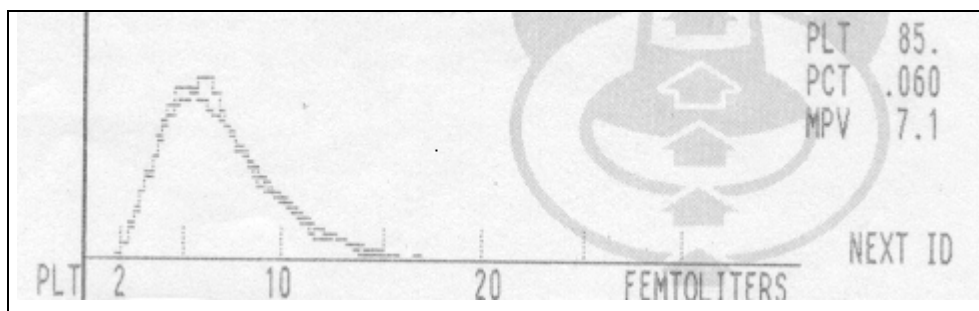
Las Pthl se controlaron analizándolas con el contador automatizado, observando la distribución del tamaño celular en el histograma o en forma manual, con la cámara de Neubauer. Se obtuvo también el recuento de las mismas, para luego llevarlas a la concentración de trabajo de acuerdo al protocolo a seguir (TEM, F).

5.3.1. Control de lavado de Pellet de Pthl (TEM)

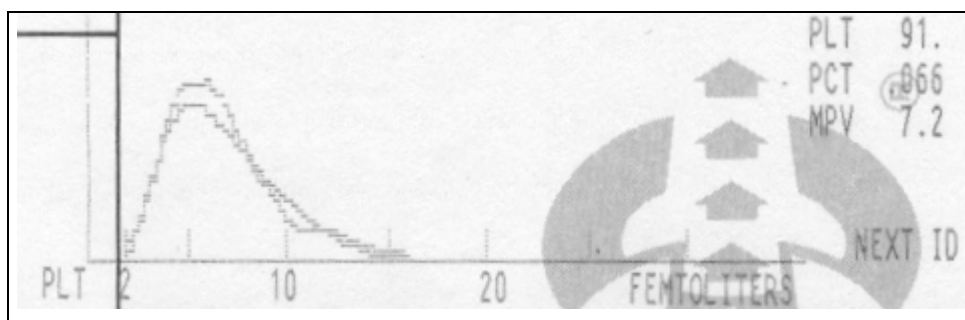
Durante el proceso, en el protocolo de trabajo para (TEM), se analizaron los controles en el contador automatizado de pellet de Pthl, después de cada lavado (3-6-9 lavados). Observándose que después de 3 y 6 lavados la distribución del tamaño celular del histograma, se mantienen, no así después de 9 lavados se redujo a la mitad. Por lo que

se demuestra que que para nuestro trabajo, contamos con la cantidad necesaria de pellet de Pthl. Figura 5.5

a)



b)



c)

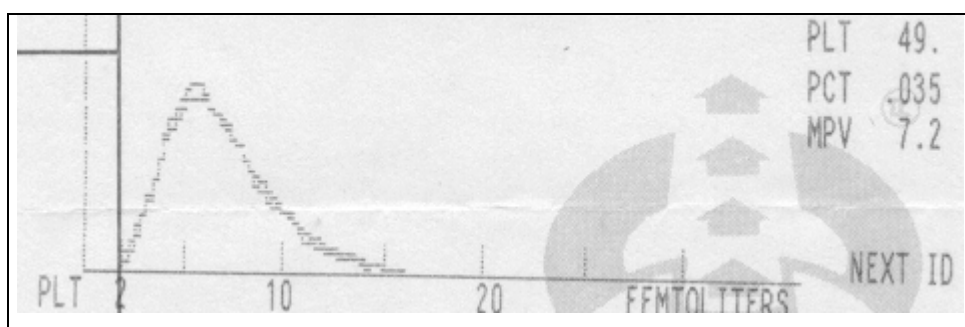
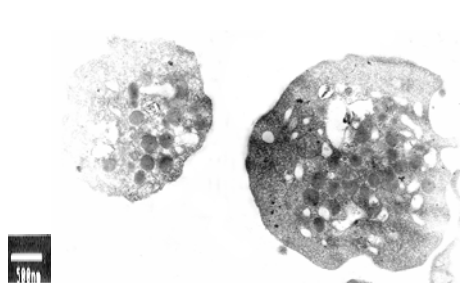


Figura 5.5. a) Pellet Pthl (3 lavados) ; b) Pellet Pthl (6 lavados); c) pellet Pthl (9 lavados)

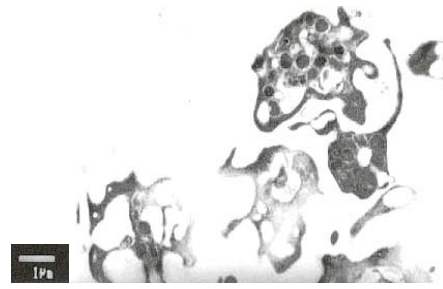
5.4. Cambios Ultraestructurales en Pthl en reposo activadas y adicionadas con Gal-1 esplénica observadas en TEM

Se evaluaron cambios ultraestructurales en Pthl en reposo activadas y adicionadas con Gal-1 esplénica observadas en TEM sección 4.4. Las fotografías de la figura 5.6. fueron obtenidas de un experimento independiente de 10 realizados, mostrando un comportamiento bifásico, como respuesta a la activación, de las plaquetas expuestas a bajas concentraciones de Gal- 1 (menores de $0,3 \mu\text{M}$) presentan marcadas alteraciones físicas, promovida por la reestructuración del citoesqueleto, que comienza con la pérdida de la forma discoide y comienza a emitir pseudopodios delgados, disminución de los gránulos y la notable expansión del SCA, que sin embargo preservan la estructura del glucocalix. En cuanto a las plaquetas adicionadas con Gal-1 a concentraciones $0,5\mu\text{M}$, en el citoesqueleto se observó, una disminución en la emisión de pseudopódios, así como de gránulos y cambios moderados del SCA. Las plaquetas expuestas a Gal-1 inhibida con lactosa ($100 \mu\text{M}$) no presentaron cambios significativos comparados con las plaquetas control (reposo).

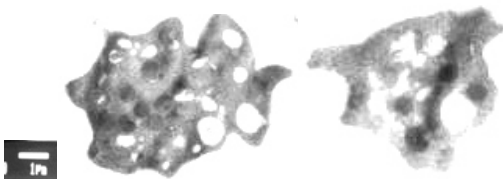
En las plaquetas activadas con trombina a distintos tiempos de activación (15 segundos, 30 segundos y 1 minuto) y adicionadas con una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ de GAL-1, se apreciaron cambios drásticos que sin embargo preservan la integridad del glicocalix, esto permitiría que los receptores en él interaccionen con los ligando correspondientes en los procesos de adhesión y activación. Los gránulos que estaban dispersos por el citoplasma, van siendo desplazados hacia el centro por la contracción del anillo de microtúbulos y los microfilamentos, para colaborar con la contracción de la plaqueta.



A



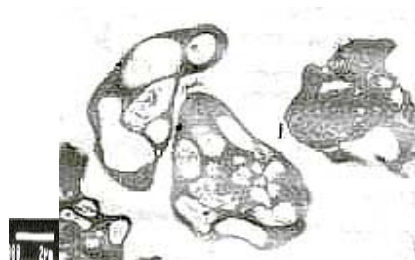
B



C



D



E

Figura 5.6. cambios ultraestructurales A). Control. Pthl en reposo. Aumento x12.000 Escala: 500nm .B). Pthl adicionadas con Gal-1 (0,1 μ M). Aumento x 5.000 Escala: 1 μ M. .C) Plaquetas adicionadas con Gal-1 (0.5 μ M). Aumento x 5.000. Escala: 1 μ M. D). Plaquetas adicionadas con Gal-1 (0.5 μ M) Inh.con Lac 100 mM (incub. 30 min. a ta). Aumento x 15.000. Escala: 500 nm. E). Plaquetas activadas con Tr (0.2 UI/ml; 0-1 min) y luego adicionadas con Gal-1 (0.5 μ M). Aumento x 4.000. Escala: 2 μ M

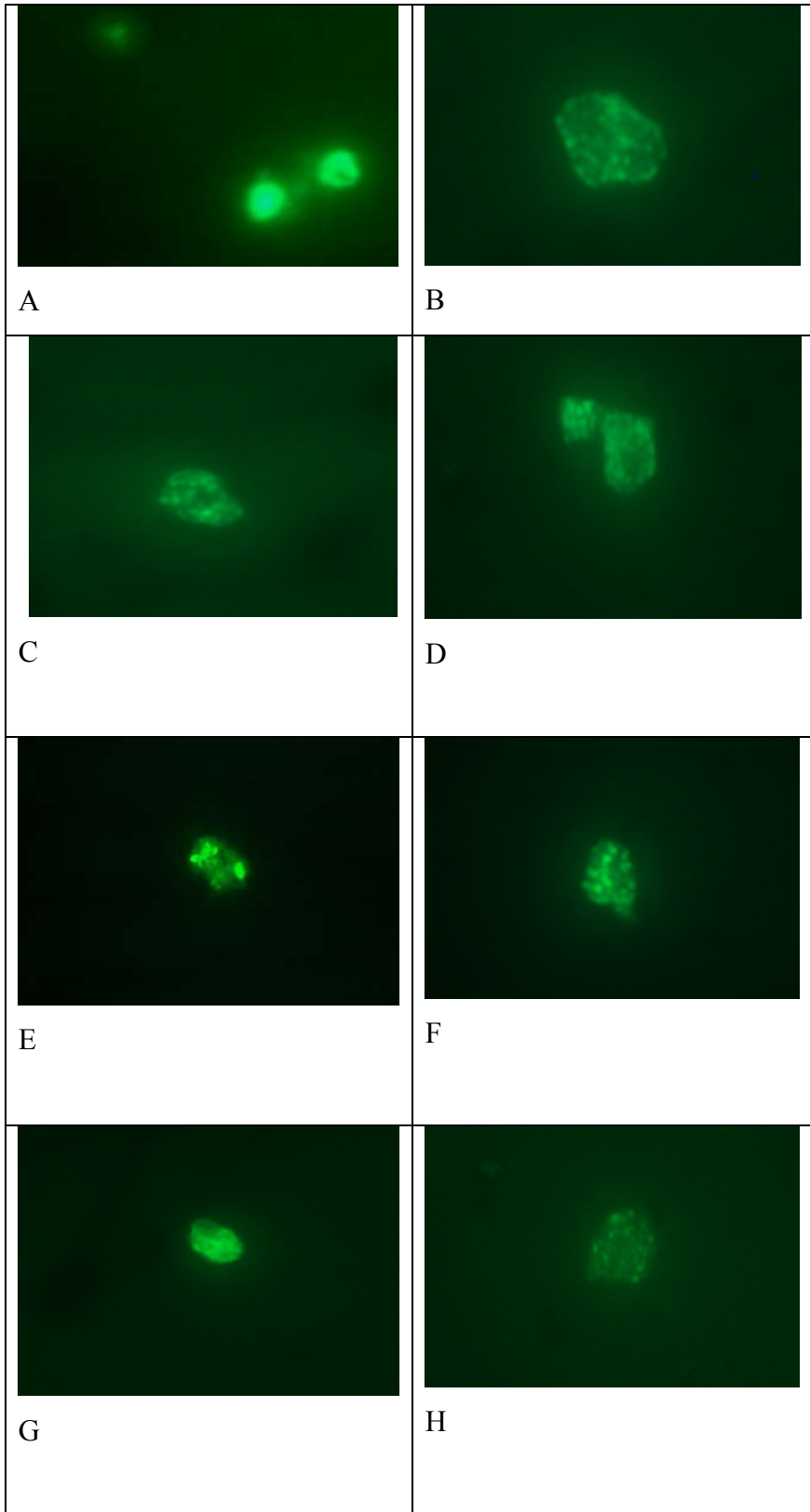
5.5. Ensayos por fluorescencia de captación de Mepacrina en Pthl en reposo activadas y adicionadas con Gal-1 y Gal-1 Inh.

Se muestran los resultados, de los ensayos de la captación de Mepacrina a través de los gránulos densos por la intensidad de fluorescencia de cada fotografía, de la Fig. 5.7 que fueron obtenidas de un experimento independiente de 6 realizados.

Examinando las microfotografías podemos concluir que los ensayos de Pthl en reposo, lavadas con prostaglandina, coloreadas con Mepacrina (Pthl control) presentan mayor intensidad de fluorescencia que las plaquetas activadas con trombina a diferentes tiempos y que las mismas adicionadas con una concentración de Gal-1 (0,1 μ M). Así mismo comparando las plaquetas activadas con Tr a diferentes tiempos y las mismas adicionadas con Gal-1 observamos una menor intensidad de fluorescencia en éstas últimas demostrando un posible sinergismo entre la Tr y Gal-1.

Por otro lado comparando las Pthl control con las Pthl en reposo incubadas con Gal-1 (0,1 μ M) y con Gal-1 In. observamos que la emisión de fluorescencia no varía entre los controles y las Pthl con Gal-1 In. , sin embargo existe menos fluorescencia en las Pthl incubadas con Gal-1 (0,1 μ M) evidenciando la posible degranulación inducida por Gal-1 como agonista.

También se observa que las Plth activadas con Tr. a 2 min. la degranulación es mayor, la presencia de mepacrina en los gránulos densos es menor expresando un déficit en la fluorescencia. Esto señala que a mayor tiempo de activación con Tr mayor degranulación y menor fluorescencia expresada.



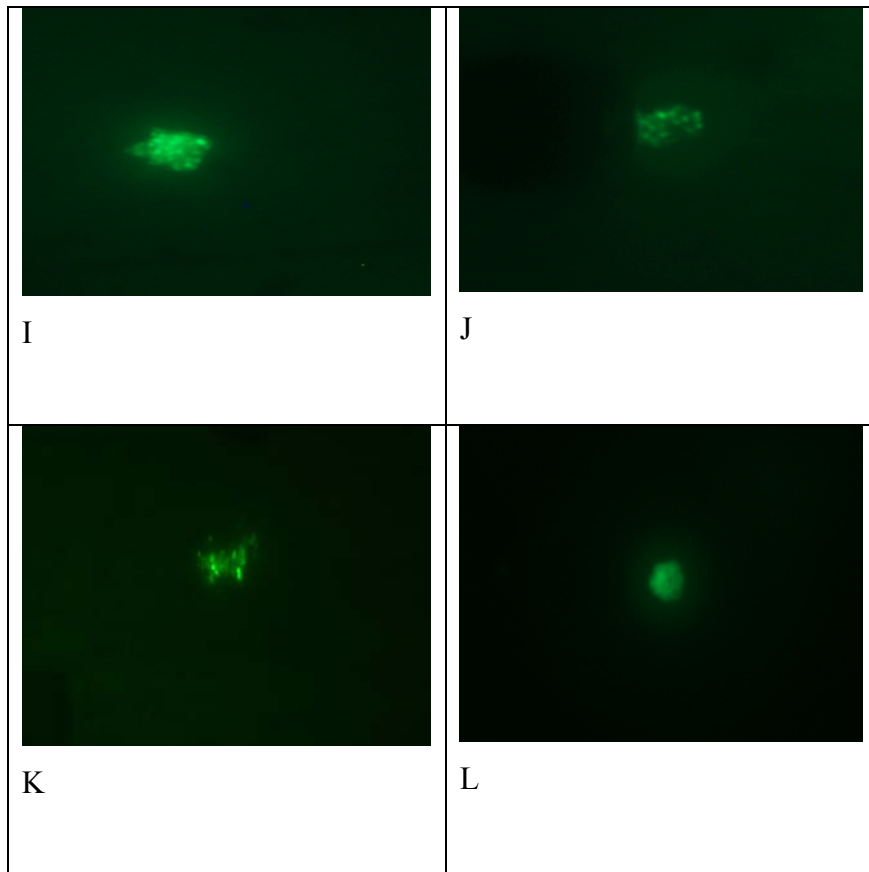


Figura 5.7. **A)** Muestra Control. Pthl en reposo; **B)** Pthl activadas con Tr. 15 seg.; **C)** Pthl activadas con Tr. 30 seg.; **D)** Pthl activadas con Tr 1 min. ; **E)** Pthl activadas con Tr. 2 min. ; **F)** Pthl con GAL-1C; **G)** Pthl con Gal-1 Inhibida; **H)** Pthl activadas con Tr. 15 seg. y con Gal-1C; **I)** Pthl activadas con Tr. 30 seg. y con Gal-1C; **J)** Pthl activadas con Tr. 1 min y con Gal-1C; **K)** Pthl activadas con Tr. 2min y con Gal-1C; **L)** Pthl lav. con Prostaglandina

6. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio demostramos que la Gal-1 esplénica porcina interacciona con plaquetas humanas en reposo y luego de la activación con trombina, mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de fluorescencia. Debido a que las galectinas constituyen una familia de proteínas filogenéticamente conservadas (Barondes et al., 1994; Elola MT y Fink NE, 2000), la identidad entre dominios que ligan carbohidratos de distintas galectinas de una especie de mamífero es de 20-40 por ciento y la homología de la Gal-1 entre distintas especies es de 80-90 por ciento (Elola MT y Fink NE, 2000). Así, estas experiencias con Gal-1 esplénica porcina, lectina de gran similitud con la Gal-1 humana, son comparables con los resultados hallados con Gal-1 obtenidas de otras especies. En estudios sobre la interacción de lectinas con glicanos de superficie, llevados a cabo con otras lectinas vegetales y animales, se obtuvieron hallazgos de interés. Así, con la finalidad de descubrir el rol funcional de los carbohidratos de la superficie celular y de los glicoligandos, se realizaron varios estudios de agregación “*in vitro*” con células sanguíneas y lectinas, llegando a la conclusión de que las lectinas producen la agregación de estas células (glóbulos rojos, linfocitos, neutrófilos, plaquetas) induciendo a cambios que pueden resultar en la activación/expresión de proteínas de adhesión sobre la superficie celular, permitiendo de esta forma, la estabilización de contactos intracelulares y, por lo tanto, favoreciendo la agregación celular (Gonzalez, MM, 2008). En los últimos años ha ocurrido un cambio gradual del paradigma debido al reconocimiento de que las proteínas se unen a glicanos de superficie de los microbios potencialmente patógenos, y de que las galectinas también funcionan como factores efectores y de reconocimiento de la inmunidad innata y su implicancia en el proceso de inflamación (Vasta GR et al., 2010). Anteriormente, en el laboratorio se habían realizado estudios en neutrófilos humanos y porcinos expuestos a Gal-1 esplénica porcina, confirmando la presencia de receptores en superficie a través de la medida de activación y degranulación de los mismos (Elola MT et al., 2005) y durante esas experiencias se evidenció la presencia de Gal -1 en plaquetas contaminantes. En relación a otras experiencias con Gal-1 exógena en plaquetas, se observó que la Gal-1 esplénica porcina interacciona con las plaquetas humanas induciendo agregación dependiente de la concentración de lectina. En particular en plaquetas, varios autores han demostrado que la Gal-1 de diferentes especies produce agregación en relación dosis-dependiente. Así, Timoshenko A V et al. (2003), evidenció dicha respuesta, utilizando Gal-1 bovina. Por otra parte, Pacienza N. et al (2008), confirmaron datos similares trabajando con Gal-1 recombinante

humana. Como se describió en la introducción, el receptor GPIIb/IIIa es un miembro de la familia de receptores de integrina, se encuentra en la superficie de plaquetas en reposo y, también en el interior de la plaqueta, principalmente en los gránulos α , en los cuerpos densos y en las membranas que delimitan el SCA.

Además otros estudios realizados en el laboratorio han demostrado por citometría de flujo e inmunofluorescencia, la presencia de galectina-1 endógena en plaquetas humanas lavadas y la detección de receptores totales utilizando Gal-1 porcina. (González M, FinK N, 2006 y Fink et al, 2007).

Esto nos motivó a analizar mediante microscopía electrónica, los posibles cambios producidos en la plaqueta intra- y/o extracelularmente, en reposo o activada con trombina, e incubada posteriormente con Gal-1 esplénica porcina. Por otra parte, se realizó el test de captación de mepacrina, para demostrar en forma cualitativa por la intensidad de fluorescencia, el grado de degranulación que tiene la plaqueta en reposo o activada, y así estudiar la morfología plaquetaria. (Billio A et al., 2001).

Mediante la metodología de microscopía electrónica de transmisión, nuestros estudios demuestran un comportamiento bifásico de las plaquetas expuestas a bajas concentraciones de Gal-1 (menores de $0,3 \mu\text{M}$), presentando marcadas alteraciones morfológicas, promovidas por la reestructuración del citoesqueleto, con la pérdida de la forma discoide, la emisión de pseudopodios, disminución de los gránulos y una notable expansión del SCA, aunque sin embargo se preserva la estructura del glucocalix. El comportamiento bifásico de la acción de la Gal-1 a diferentes concentraciones, ha sido descrito en diferentes estudios, sugiriendo que su efecto depende del estado de activación y del tipo celular aunque algunos proponen que puede ser influenciado por una distribución relativa de las formas monomérica-dimérica de la lectina. (Wells y Mallucci, 1991, Admas et al., 1996; Sacchetti et al., 2001). También se ha descrito que la Gal-1 causa un efecto bifásico, comparativamente a nuestros resultados con Gal-1 porcina sección 4.5 (Fig.5.6) en ensayos de crecimiento celular. A altas dosis (aproximadamente $1\mu\text{M}$), inhibe la proliferación independientemente de su actividad de unión a hidratos de carbono, y a bajas concentraciones (aproximadamente 1 nM) es mitogénica y su actividad es inhibida por lactosa. (Adams et al., 1996; Vasta et al., 2005).

En nuestro trabajo, observamos cambios característicos de activación plaquetaria drástica en plaquetas activadas con Tr y adicionadas con una concentración fija de Gal-

1 (0,5 μ M) (Figura. 5.6). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos, mediante inmunohistoquímica (González MM y FinK NE, 2006) y citometría de flujo (González MM et al., 2007). Así, se puede concluir que la interacción de Gal-1 con un ligando/receptor, tipo integrinas sería la responsable de los cambios morfológicos ultraestructurales relacionados con funciones como cambio de forma, adhesión, agregación plaquetaria. Consideramos que el alto poder de resolución del microscopio electrónico y la aplicación de una metodología adecuada (que evite la activación de las plaquetas preservando todas las estructuras intraplaquetarias), es una herramienta fundamental para el diagnóstico de alteraciones de la estructura plaquetaria. Entre los rasgos apreciables que se evidencian, podemos destacar las alteraciones de los gránulos, no solo en el aspecto cuantitativo sino también cualitativo por la presencia de formas anómalas con la disminución de la electrodensidad en los gránulos densos o presencia de gránulos alfa gigantes. La formación de complejos del SCA, de STD o mixtos, es otra alteración característica de algunos procesos. Así mismo pueden observarse señales morfológicas sugestivas de activación plaquetaria *in vivo*, como disminución de la forma discoide, emisión de pseudópodos o centralización de gránulos.

En cuanto a los resultados de captación/liberación de Mepacrina por los gránulos densos, se encontró un posible sinergismo entre las Plth activadas con Tr a diferentes tiempos y las mismas adicionadas con Gal-1 (0,1 μ M), concentración elegida por demostrar cambios apreciables en la ultraestructura plaquetaria. El efecto sinérgico podría deberse a la interacción de la Gal-1 con el complejo GPIIb/IIIa, como mencionamos más arriba. Nuestros resultados quedan demostrados por la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida (comparado con los controles, Figura 5.7) debido a la degranulación plaquetaria producto de la activación tanto con Tr como con la Gal-1 porcina. El ensayo de captación de mepacrina ha sido aplicado tanto al estudio de la patología plaquetaria humana como en la investigación del disfuncionalismo plaquetario en animales. Así se ha descrito anomalías en diferentes cepas de ratones con enfermedad de pool de depósito plaquetario. Estos estudios se llevaron a cabo en siete diferentes mutaciones recesivas de ratones con déficit pigmentario asociado con sangrado aumentado (Reddington et al, 1987). Es de remarcar, que aunque por causas diferentes, la similitud de las microfotografías de este trabajo y las mostradas en la presente tesis, obtenidas en condiciones experimentales en la reacción de liberación de mepacrina, es notoria.

Otra consideración de interés sobre la prueba de la mepacrina es que ha sido transferida a la metodología de citometría de flujo con el objetivo de estudiar la captación/liberación del compuesto por los gránulos densos. Esta metodología se sumó a otras como luminoagregometría, la incorporación/liberación de serotonina radioactiva y la microscopía electrónica para lograr un diagnóstico más exacto de los desordenes adquiridos y congénitos de los desordenes plaquetarios. Así se ha estudiado a pacientes con la enfermedad de Hermansky- Pudlack que tiene una deficiencia en los gránulos densos que es característica

Una desventaja de esta técnica es que en estudios anteriores se ha demostrado que la Mepacrina inhibe la fosfolipasa A2 y la producción del ácido lisofosfatídico, que participa en la transducción de señal para la liberación de los gránulos densos, por lo tanto la presencia de un agonista fuerte como la trombina o mAb7 (un anticuerpo monoclonal contra p2/ CD9) es necesario para estimular la liberación de los gránulos densos (Wall J et al., 1995).

Con respecto a las plaquetas activadas con Tr a una concentración única y a diferentes tiempos de activación (Figura 5.7) podemos observar un descenso de la fluorescencia a los 2 minutos debido a una mayor liberación de gránulos densos. Estos resultados concuerdan con otros hallazgos donde describen que la Tr induce la liberación de los gránulos densos, los cuales captan la mepacrina dentro de los primeros 5 minutos continuando hasta alcanzar una meseta a los 15 (Wall J et al., 1995). En nuestros experimentos si bien se observó un descenso de la fluorescencia, no nos fue posible establecer con la técnica de microscopía de fluorescencia, una relación entre la intensidad de la fluorescencia y la de la activación con Tr. Esto permite suponer que la Gal-1 porcina podría actuar por algún mecanismo de transducción de señal, provocando la liberación de gránulos, aunque funcionando como un agonista más débil que la Tr .

Debido a que las plaquetas participan en la homeostasis celular, inflamación y progresión tumoral, ampliamos nuestros estudios de ultraestructura plaquetaria donde evaluamos la acción de Gal-1 esplénica porcina en Plth utilizando diferentes metodologías.

Debido a la importancia de las funciones que las plaquetas desempeñan, desde su descubrimiento, ha habido un interés especial en el desarrollo de técnicas de laboratorio que permitan valorar su funcionalidad. Como las funciones son muy diversas y complejas, se hace necesario emplear una batería de técnicas, porque una sola no podría

dar información sobre las potenciales disfunciones plaquetarias. Entre las numerosas técnicas empleadas, la TEM y la captación/liberación de mepacrina son dos de las pruebas usadas, razón por la cual estas metodologías, con diversos agonistas que incluyan a la Gal-1, podrían ser de interés en el estudio de diversas patologías en animales y en humanos (Rivera J, 2007). El efecto observado de Gal-1 y un mejor conocimiento de los mecanismos afectados en la plaqueta, podrían hacer que, a futuro, se la emplee en una metodología rápida para la detección de defectos de la función plaquetaria.

Considerando perspectivas futuras, la Gal-1 podría cumplir roles biológicos esenciales, en la plaqueta, así el esclarecimiento de esas funciones permitiría aplicar esos conocimientos al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de trastornos autoinmunes, infecciones, reacciones alérgicas, procesos inflamatorios y fenómenos de diseminación tumoral, procesos en los cuales, las plaquetas también son piezas claves

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbott WM, Feizi T. Evidence that the 14 kDa soluble beta-galactoside-binding lectin in man is encoded by a single gene. *Biochem J.* 1989; 259(1): 291-4.
- Adams L, Scott GK, Weinberg CS. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1312(2):137-44.
- Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology.* 2004; 14(9): 817-25.
- Ahmed H, Du SJ, O'Leary N, Vasta GR. Biochemical and molecular characterization of galectins from zebrafish (*Danio rerio*): notochord-specific expression of a prototype galectin during early embryogenesis. *Glycobiology.* 2004; 14(3): 219-32.
- Ahmed H, Fink NE, Vasta GR. Elasmobranch and teleost fish contain thiol-dependent beta-galactoside-binding lectins that are cross-reactive with those identified and characterized in bovine spleen. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 712:318-20.
- Ahmed H, Pohl J, Fink NE, Strobel F, Vasta GR. The primary structure and carbohydrate specificity of a -galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. *J Biol Chem;* 1996; 271:33083-33094
- Akazawa C, Nakamura Y, Sango K, Horie H, Kohsaka S. Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system: its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neuroscience.* 2004; 125(1): 171-8.
- Akkerman JWN, Verhgoeven AJM. Energy metabolism and function, in *Platelet Responses and Metabolism*, edited by H Holmsen, 1987; 3rd ed., 69.
- Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol.* 2002; 168(8): 4034-41.
- Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9): 575-81.

Bachelot C, Cano E, Grelac F, Saleun S, Druker BJ, Levy-Toledano S, et al. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. Simultaneous studies with different agonists and inhibitors. *Biochem J.* 1992; 284 (Pt 3): 923-8.

Barkalow KL, Falet H, Italiano JE Jr, van Vugt A, Carpenter CL, Schreiber AD, et al. Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285(4): C797-805.

Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994; 269(33): 20807-10.

Bennett JS. Molecular biology of platelet membrane glycoproteins. *Blood.* 1990; 27: 186-204.

Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest.* 2005; 115(12): 3363-69.

Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood.* 1993; 82(10): 3034-44.

Bick RL. Antiphospholipid thrombosis syndromes: etiology, pathophysiology, diagnosis and management. *Int J Hematol.* 1997; 65(3):193-213

Billio A, Moeseneder C, Donazzan G, Triani A, Pescosta N, Coser P. Hermansky-Pudlak syndrome: clinical presentation and confirmation of the value of the mepacrine-based cytofluorimetry test in the diagnosis of delta granule deficiency. *Haematologica.* 2001; 86(2): 220.

Bodin S, Viala C, Ragab A, Payrastre B. A critical role of lipid rafts in the organization of a key Fc γ RIIa-mediated signaling pathway in human platelets. *Thromb Haemost.*; 2003; 89(2):318-30.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

Brewer CF, Miceli MC, Baum LG. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 2002; 12(5): 616-23

Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Maurage CA, Lahm H, et al. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.* 2001; 11(1): 12-26.

Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*; 2006 ; 16(11):137-157

Catimel B, Parmentier S, Leung LL, McGregor JL. Separation of important new glycoproteins (GPIa, GPIc, GPIc*, GPIIa and GMP140) by f.p.l.c. Characterization by monoclonal antibodies and gas-phase sequencing. *Biochem J* 1991; 279(2): 419-425.

Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. *Glycoconj J.* Galectin genes: regulation of expression. 2004; 19(7-9):441-9.

Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, et al. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer.* 1999; 86(11): 2353-63.

Clemetson K, McGregor JL, James E, Dechavanne M, Lüscher EF. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest.* 1982; 70(2): 304-11.

Clemetson K. Platelets receptors and functional disorders. *Schweiz Med Wschr* 1991; 121(Suppl 43): 12-23.

Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, et al. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry.* 1988; 27(2):692-9.

Coller BS. Disorders of platelets. En: Ratnoff OD, Forbes CD, editores. Disorders of hemostasis. Orlando: Grune & Stratton; 1984. p.73-176.

Colnot C, Fowlis D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn*. 1998; 211(4): 306-13.

Colnot C, Sidhu SS, Balmain N, Poirier F. Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Dev Biol*. 2001; 229(1): 203-14.

Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 1999; 9(10): 979-84.

Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol*. 1991; 115(5): 1437-48.

Couraud PO, Casentini-Borocz D, Bringman TS, Griffith J, McGrogan M, Nedwin GE. Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J Biol Chem*. 1989; 264(2): 1310-6.

Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, et al. *Essentials of Glycobiology*. 2^a ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

Dam TK, Brewer CF. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry*. 2008; 47(33): 8470-6.

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572(2-3): 285-93.

De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW 2nd, Ruggeri ZM. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem*. 1991; 266(35): 23776-83.

Debus E, Weber K, Osborn M. The cytoskeleton of blood platelets viewed by immunofluorescence microscopy. *Eur J Cell Biol*. 1981; 24(1): 45-52.

Dettin L, Rubinstein N, Aoki A, Rabinovich GA, Maldonado CA. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol Reprod.* 2003; 68(1): 51-9.

Di Cera E. Thrombin interactions. *Chest.* 2003; 124(3):115-75.

Dias-Baruffi M, Stowell SR, Song SC, Arthur CM, Cho M, Rodrigues LC, et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology.* 2010; 20(5): 507-20.

Diaz-Ricart M, Escolar G, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. En: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias.* Barcelona: Mosby/Doyma; 1995. p.11-44.

Dorahy DJ, Lincz LF, Meldrum CJ, Burns GF. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J.* 1996; 319 (Pt 1): 67-72.

Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Estrov Y, Lotan D, Lotan R. Induction of differentiation and apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP by sodium butyrate and galectin-1. *Int J Oncol.* 1999; 14(2): 225-32.

Elola MT, Chiesa ME, Fink NE. . Activation of oxidative burst and degranulation of porcine neutrophils by a homologous spleen galectin-1 compared to N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 2005; 141(1): 23-31.

Elola MT, Fink NE. Galectinas: estructura, especificidad glicídica y ligandos específicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2000; 34(3): 293-330.

Escolar G, White JG. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost.* 2000; 83(3): 371-86.

Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, et al. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec.* 2000; 258(1): 90-9.

Falet H, Chang G, Brohard-Bohn B, Rendu F, Hartwig JH. Integrin alpha(IIb)beta3 signals lead cofilin to accelerate platelet actin dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289(4):C819-25.

Fang R, Mantle M, Ceri H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J*. 1993; 293(Pt 3): 867-72.

Fautsch MP, Silva AO, Johnson DH. Carbohydrate binding proteins galectin-1 and galectin-3 in human trabecular meshwork. *Exp Eye Res*. 2003 Jul;77(1):11-6.

Fauvel F, Legrand YJ, Kühn K, Bentz H, Fietzek PP, Caen JP. (1979). Platelet adhesion to type III collagen: involvement of a sequence of nine aminoacids from alpha 1 (III) CB peptide. *Thromb Res.*; 1979; 16 (1-2): 269-73

Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*. 2005; 105(10):3879-87.

Fowles D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn*. 1995; 203(2): 241-51.

Fox JE, Reynolds CC, Johnson MM. Identification of glycoprotein Ib beta as one of the major proteins phosphorylated during exposure of intact platelets to agents that activate cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1987; 262(26): 12627-31.

Fox JE. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost*. 2001; 86(1): 198-213.

Fressinaud E, Meyer D. von Willebrand factor and platelet interactions with the vessel wall. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991; 2(2): 333-40.

Fujimoto T, Fujimura K, Kuramoto A. Functional Ca²⁺ channel produced by purified platelet membrane glycoprotein IIB-IIIa complex incorporated into planar phospholipid bilayer. *Thromb Haemost*. 1991; 66(5): 598-603.

Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008; 359(9): 938-49.

Gal Iglesias B, López Gallardo M, Martín Velasco AI, Prieto Montalvo J. Bases de la fisiología. 2ª ed. Editorial Tebar: Madrid, 2007. p.138

García E, Jay D. Filamina plaquetaria: Una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular. *Archivos de Cardiología de México.* 2006; 7667-75.

Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007; 109(5): 2058-65.

George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest.* 1986; 78(2): 340-8.

Ginsberg MH, Xiaoping D, O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF. Platelet integrins. *Thromb Haemost.* 1993; 70(1): 87-93.

Gitt MA, Barondes SH. Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(20): 7603-7.

Gitt MA, Barondes SH. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. *Biochemistry.* 1991; 30(1): 82-9.

González MM, Pistaccio L, Fink N. Galectin-1 binding to human platelets. Acta del congreso: 2007, 17th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Amsterdam. Holanda.

González MM. Interacción de galectina-1 esplénica porcina con plaquetas humanas. [Tesis de Maestría]. La Plata; 2008. (En proceso de publicación).

González MM. y Fink NE. Localización inmunohistoquímica de ligandos de galectina-1 en plaquetas humanas. Acta del congreso: 2006, 51a Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. Argentina.

Gordge MP. Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol.* 2005; 145(3): 271-3.

Grüner S, Prostedna M, Koch M, Miura Y, Schulte V, Jung SM, et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood.* 2005; 105(4): 1492-9.

Hagberg IA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets.* 2000; 11(3): 137-50.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 1999; 94(11): 3791-9.

Hirabayashi J, Ayaki H, Soma G, Kasai K. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 1008(1): 85-91.

Hirabayashi J, Kasai K. Complete amino acid sequence of a beta-galactoside-binding lectin from human placenta. *J Biochem.* 1988; 104(1): 1-4.

Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology.* 1993; 3(4): 297-304

Hittelet A, Legendre H, Nagy N, Bronckart Y, Pector JC, Salmon I, et al. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer.* 2003; 103(3):370-9.

Holmsen H, Walsh PN, Koike K, Murphy S, Holme S, Johnson MM, et al. Familial bleeding disorder associated with deficiencies in platelet signal processing and glycoproteins. *Br J Haematol.* 1987; 67(3):335-44.

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473(1): 172-85.

Hynes MA, Gitt M, Barondes SH, Jessell TM, Buck LB. Selective expression of an endogenous lactose-binding lectin gene in subsets of central and peripheral neurons. *J Neurosci.* 1990; 10(3): 1004-13.

Iglesias MM, Rabinovich GA, Ivanovic V, Sotomayor C, Wolfenstein-Todel C. Galectin-1 from ovine placenta--amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem.* 1998 ; 252(3) :400-7.

Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007; 109(12): 5087-95.

Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 1999; 103(6):879-87.

Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood.* 2003; 102(5):1701-7.

Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6:329-57.

Kuijpers MJ, Schulte V, Bergmeier W, Lindhout T, Brakebusch C, Offermanns S, Fässler R, Heemskerk JW, Nieswandt B. Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J.*; 2003; 17(6): 685-7.

Kunicki TJ, Pidard D, Jean-Philippe Rosa, Nurden AT. The formation of Ca⁺⁺ - dependent complexes of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. *Blood.* 1981; 58(2): 268-278.

Lam SC, Plow EF, Ginsberg MH. Platelet membrane glycoprotein IIb heavy chain forms a complex with glycoprotein IIIa that binds Arg-Gly-Asp peptides. *Blood.* 1989; 73(6): 1513-8.

Lecut C, Feeney LA, Kingsbury G, Hopkins J, Lanza F, Gachet C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M. Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(12):2653-62.

Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9): 433-40.

Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(4): 1428-32.

Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect.* 2007; 20(7): 455-60.

Llau Pitarch. *Tratado de medicina transfusional perioperatoria.* España: Elsevier; 2010. p.52.

Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem.* 1993; 268(36): 27034-8.

Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2002; 277(21): 18801-9.

López-Lucendo MF, Solís D, André S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, et al. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol.* 2004; 343(4): 957-70.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest.* 1997; 99(6): 1351-60.

Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 1993; 7(6): 516-22.

Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M. . Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.*; 2004; 18(2):397-9.

Maurice P, Legrand C, Fauvel-Lafeve F. Platelet adhesion and signaling induced by the octapeptide primary binding sequence (KOGEOGPK) from type III collagen. *FASEB J.* 2004; 18(12): 1339-47.

Maurice P, Waeckel L, Pires V, Sonnet P, Lemesle M, Arbeille B, Vassy J, Rochette J, Legrand C, Fauvel-Lafève F. The platelet receptor for type III collagen (TIIICBP) is present in platelet membrane lipid microdomains (rafts). *Histochem Cell Biol.* 2006; 125(4): 407-17.

McEver RP, Baenziger JU, Majerus PW. Isolation and structural characterization of the polypeptide subunits of membrane glycoprotein IIb-IIIa from human platelets. *Blood.* 1982; 59(1): 80-5.

McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2001; 86(3): 746-56.

Mehrabian M, Gitt MA, Sparkes RS, Leffler H, Barondes SH, Lusic AJ. Two members of the S-lac lectin gene family, LGALS1 and LGALS2, reside in close proximity on human chromosome 22q12-q13. *Genomics.* 1993; 15(2): 418-20.

Mercier S, St-Pierre C, Pelletier I, Ouellet M, Tremblay MJ, Sato S. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. *Virology.* 2008; 371(1): 121-9.

Merkle RK, Zhou Q, Schultz TK, Harper WB, Cummings RD. Characterization of an S-type lectin purified from porcine heart. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 274: 404-416.

Meyer D, Girma JP. von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost.* 1993; 70(1): 99-104.

Michalak M, Mariani P, Opas M. Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol.* 1998; 76(5): 779-85.

Michelson AD, Barnard MR. Plasmin-induced redistribution of platelet glycoprotein Ib. *Blood*. 1990; 76(10):2005-10.

Michelson AD. Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Semin Thromb Hemost*. 1992; 18(1): 18-27.

Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem*. 1992; 267(1): 364-9.

Moiseeva EP, Javed Q, Spring EL and de Bono DP. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res*. 2000 ; 45: 493-502.

Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res*. 1999; 36: 47-58.

Moiseeva EP, Williams B and Samani NJ. Galectin-1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003a; 1619: 125-132.

Moix Pujol N. Trombocitopenias. 2ª ed. México: Elsevier; 2001

Monnet E, Fauvel-Lafève F. A new platelet receptor specific to type III collagen. Type III collagen-binding protein. : *J Biol. Chem*. 2000; 275(15):10912-7.

Monteiro MC, O'Connor JE, Martínez M. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Rev Diagn Biol*. 2001; 50(3): 111-136.

Morgenstern, E. Human platelet morphology/ultrastructure. En: Bruchhausen F, Walter U, editores. *Platelets and Their Factors*. Berlin: Springer-Verlag; 1997. p.27-60

Moriau M, Lavenne EP, Scheiff JM, Debeys CC. The relationship between endothelium, subendothelium, and platelets. En: Moriau M, Lavenne EP, Scheiff JM, Debeys CC, editores. *Blood platelets*. Paris: Halograme; 1990. p.13-49

Morris S, Ahmad N, André S, Kaltner H, Gabius HJ, Brenowitz M, et al. Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology*. 2004; 14(3): 293-300.

Naik UP, Kornecki E, Ehrlich YH. Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ecto-protein kinase/phosphatase system. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1092: 256

Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN, et al. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol*. 2001; 167(10): 5697-707.

Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, et al. Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood*. 2001; 97(12):3829-35.

Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*. 1987; 70(3): 838-45.

Nurden AT, Dupuis D, Kunicki TJ, Caen JP. Analysis of the glycoprotein and protein composition of Bernard-Soulier platelets by single and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Invest*. 1981; 67(5): 1431-40.

Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins and their clinical aspects. En: Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J, editores. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven: Int Soc Haem Thromb and Leuven University Press; 1987. p.93-125.

Nurden P, Bihour C, Combrie R, Gralnick H, Nurden AT. Glycoprotein Ia-Iia (VLA-2) and glycoprotein Ib-IX complexes are processed independently during thrombin-induced platelet activation. *J Lab Clin Med*. 1994; 124(4):579-88.

Nurden P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. *Thromb Haemost*. 1997; 78(5): 1305-15.

Ouellet M, Mercier S, Pelletier I, Bounou S, Roy J, Hirabayashi J, et al. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol*. 2005; 174(7): 4120-6.

Pace KE, Lebestky T, Hummel T, Arnoux P, Kwan K, Baum LG. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. Expression in developing immune, neural, and muscle tissues. *J Biol Chem*. 2002; 277(15): 13091-8.

Pacienza N, Pozner RG, Bianco GA, D'Atri LP, Croci DO, Negrotto S, et al. The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. *FASEB J*. 2008; 22 (4):1113-23

Parise LV, Criss AB, Nannizzi L, Wardell MR. Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood*. 1990; 75(12): 2363-8.

Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*. 2004; 306(5693): 120-4.

Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3348-54.

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*. 2001; 20(51): 7486-93.

Peerschke EI. Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Clin Pathol*. 1992; 98(4): 455-63.

Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med*. 1997; 185(10): 1851-8.

Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell*. 1991; 65(3): 359-62.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*. 1994; 367(6460): 243-9.

Preissner KT, Jenne D. Structure of vitronectin and its biological role in haemostasis. *Thromb Haemost*. 1991; 66(1): 123-32.

Pulcinelli FM, Daniel JL, Riondino S, Gazzaniga PP, Salganicoff L. Fibrinogen binding is independent of an increase in intracellular calcium concentration in thrombin degenerated platelets. *Thromb Haemost*. 1995; 73(2):304-8.

Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*. 1998; 160(10): 4831-40.

Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol*. 2007b; 66(2-3): 143-58.

Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui MC, Kier-Joffé EB, et al. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ*. 2002b; 9(6): 661-70.

Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta*. 2002a; 1572(2-3): 274-84.

Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rubinstein N. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J*. 2004; 19(7-9): 565-73.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*. 2007a; 17(5): 513-20.

Radley JM, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol*. 1983; 53(2): 277-87.

Reddington M, Novak EK, Hurley E, Medda C, McGarry MP, Swank RT. Immature dense granules in platelets from mice with platelet storage pool disease. *Blood*. 1987; 69(5): 1300-6.

Redondo PC, Harper AG, Sage SO, Rosado JA. Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets. *Cell Signal*. 2007; 19(10): 2147-54

Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009; 94(5): 700-11.

Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Corral J, González Conejero R, et al. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica*. 2007; 92 (Extra 1):48-62.

Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood*. 1991; 77(1): 5-19.

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ibarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004; 5(3): 241-51.

Ruggeri ZM. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Prog Hemost Thromb*. 1991;10:35-68.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991; 87(1): 1-5.

Sacchettini JC, Baum LG, Brewer CF. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*. 2001; 40(10): 3009-15.

Sasaki T, Hirabashi J, Manya H, Kasai K, Endo T. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*. 2004; 14: 357-363.

Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J*. 2004; 19(7-9): 583-91.

Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 2006; 75(2): 289-96.

Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 2006; 75(2): 289-96.

Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson K, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost.* 1998; 79(5): 885-96.

Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem.* 1998; 273(21):13047-52.

Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985; 260(20): 11107-14.

Shattil SJ. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alpha IIb beta 3. *Thromb Haemost.* 1993; 70(1): 224-8.

Sheehan JP and Sadler JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(12): 5518-22.

Shrimpton CN, Borthakur G, Larrucea S, Cruz MA, Dong JF, López JA. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med.* 2002; 196(8): 1057-66.

Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 2004; 103(4): 1333-41.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*; 5;1997. 387(6633):569-72

Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. [Adhesion of blood platelets. II. Adhesive proteins and their receptors: physiology and pathology]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 1989; 133(29): 1444-8.

Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985; 101(3): 880-6.

Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol.* 2008; 180(5): 3091-102.

Suzuki H, Nakamura S, Itoh Y, Yamazaki H, Tanoue K. Immunocytochemical evidence for the translocation of a-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin α IIb β 3) of human platelets to the surface membrane during the release reaction. *Histochemistry;* 1992; 97: 381.

Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, et al. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem.* 2002; 277(24): 21561-6.

Tanaka K, Itoh K. Reorganization of stress fiber-like structures in spreading platelets during surface activation. *J Struct Biol.* 1998; 124(1): 13-41.

Ternisien C, Jandrot-Perrus M, Huisse MG, Guillin MC. Effect of phosphopyridoxylation on thrombin interaction with platelet glycoprotein Ib. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991; 2(4): 521-8.

Timoshenko AV, Gorudko IV, Maslakova OV, André S, Kuwabara I, Liu FT, et al. Analysis of selected blood and immune cell responses to carbohydrate-dependent surface binding of proto- and chimera-type galectins. *Mol Cell Biochem.* 2003; 250(1-2): 139-49.

van den Brûle F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):537-42.

Vas V, Fajka-Boja R, Ion G, Dudics V, Monostori E, Uher F. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells*. 2005; 23(2): 279-87.

Vasta GR, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol*. 1999; 23(4-5): 401-20.

Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(6): 424-38.

Verhoeven AJ, Tysnes OB, Aarbakke GM, Cook CA, Holmsen H. Turnover of the phosphomonoester groups of polyphosphoinositol lipids in unstimulated human platelets. *Eur J Biochem*. 1987; 166(1) :3-9.

Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegi B, Than GN, Bohn H. Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Eng*. 2001; 14(11): 875-80.

Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mARNsplicing. *Mol Cell Biol*. 1997; 4730-4037

Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol*. 1995; 89(2): 380-5.

Wells V, Davies D, Mallucci L. Cell cycle arrest and induction of apoptosis by beta galactoside binding protein (beta GBP) in human mammary cancer cells. A potential new approach to cancer control. *Eur J Cancer*. 1999; 35(6):978-83.

White JG, Krumwiede M, Burris SM, Heagan B. Isolation of microtubule coils from platelets after exposure to aggregating agents. *Am J Pathol*. 1986; 125(2): 319-26.

Wonerow P, Obergfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, et al. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase C gamma 2 regulation in platelets. *Biochem J*. 2002; 364(3): 755-65.

Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem.* 1986; 261(32): 15242-51.

Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008; 10:e17.

Youssefian T, Massé JM, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood.* 1997; 89(11) :4047-57

Zobel CR, Manuel H. The platelet reticular network. *J Ultrastruct Res.* 1984; 89(1): 89-97.