



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

“Galectina-1: detección, caracterización, actividades biológicas e interacciones en plaquetas humanas”

Tesista: Bioq. MSc Mariana Marta González

Directora: Dra. Nilda E. Fink

Año 2017

A mis padres por haberme dado la vida terrenal y a Dios por haberme dado la posibilidad de seguirla viviendo...valorándola a cada instante...sin velos...

Agradecimientos

A **mi padre**, porque entre los grandes valores que me transmitió, rescato el haberme enseñado a que sin esfuerzo y perseverancia nada se logra, que vale la pena seguir luchando día a día, sorteando las adversidades, aprendiendo de ellas...y a pesar de su ausencia física desde hace cinco años, sigue guiando mis pasos.

A **mi madre**, por ser mi mano derecha, acompañándome, apoyándome y ayudándome por sobre todas las cosas a cuidar a mis hijos en mis momentos de ausencia, facilitando que pudiera lograr esta meta tan anhelada.

A **mi fiel compañero, mi esposo**, por caminar a mi lado siempre, a pesar de las fuertes tormentas que azotaron nuestras vidas estos últimos años, brindándome todo su amor y contención.

A **mis dos hijos Gabriel y Damián**, mis soles, que iluminan mis días con su amor incondicional, siendo los motores mas importantes de este viaje, dándole a mi vida la importante tarea de ser, por sobre todas las cosas, su “madre”...

Al resto de mis **familiares y amigos**, hermanos (**Jorge y Carmen**), sobrinos (**Abril, Astor, Priscila y Umma**), mis suegros (**Eva y Carlos**), tíos, cuñados, por estar siempre a mi lado. Destacando a mi tía **Ester** por su contención y apoyo incondicional. A mi tío **Faustino (bocha)**, por su presencia y preocupación constante. A mis tías políticas **Rosa y Maria Marta** por ser parte de mi familia. A mi padrino **Héctor**, por ocupar un lugar muy importante en mi vida, sobre todo luego de la ausencia de mi padre. A mis primos **Elizabeth (Babetita), Rosana, Graciela, Begoña y Carlitos** por haberme acompañado en mis días difíciles, agradeciéndoles cada visita o llamado con palabras de aliento. A **Hebe** mi abuela del corazón, por volver a sentir el cariño y dulzura que solo puede transmitir una abuela. A **Mercedes**, porque construimos una amistad que atraviesa las barreras de la distancia, permaneciendo y creciendo en el tiempo. A **Laura**, mi amiga del alma, mi hermana del corazón, que inesperadamente partió hace un año, dejando un enorme vacío en mi vida. A mis amigos: **Florencia, Susana, Sandra V., Cecilia, Marcela, Analía, Isabel, Sandra A., Claudia, Karina, Eugenia, Mariela, Constanza, Viviana, Norma y Marcelo** por cruzarse en mi camino en algún momento de mi vida y haber construido puentes inquebrantables.

A la **Dra. Nilda Fink**, por apoyarme todos estos años, transmitiéndome su experiencia y conocimientos, enseñándome día a día la ardua tarea de investigar.

A la **Dra. Maria Fernanda Troncoso**, por abrirme las puertas del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas Prof. Dr. “Alejandro C. Paladini”, Departamento de Química Biológica, Facultad de

Agradecimientos

Farmacía y Bioquímica, UBA, entrenándome en las técnicas de biología molecular, para obtener la Gal-1 recombinante humana empleada en este trabajo, brindándome su apoyo y ayuda permanente.

*Al **Dr. Mario Aguilar** por su enorme generosidad, permitiéndome utilizar el equipamiento necesario para poder desarrollar la técnica de obtención de la Gal-1 recombinante humana en el IBBM.*

*A la **Dra. María Isabel Vizcuarrenaga**, por ayudarme amablemente, en el entrenamiento de la metodología de estudio de plaquetas en el Laboratorio Diagno-Lab. Lamentablemente ya no está entre nosotros.*

A todo el equipo del Banco de Sangre de ciudad de La Plata, por su colaboración en la recolección de los concentrados plaquetarios y del plasma rico en plaquetas, debido a que sin su buena predisposición y ayuda, este trabajo no se hubiera podido realizar.

*Al personal del **CIDCA**, **CINDEFI** y **Facultad de Ciencias Veterinarias** que en diferentes formas colaboraron para la realización de esta tesis.*

*Al **Dr. Eduardo Gaddi** y a la **Dra. María Elena Chiesa**, que junto a mis compañeros de cátedra: **Alejandra, Fernando y Diego** me acompañaron en todo momento. Debo agradecer también a **Susana**, no docente, por su colaboración y ayuda permanente en las tareas de laboratorio.*

*Al **Dr. Néstor Caffini**, por su enorme solidaridad y dedicación, brindándome su colaboración desinteresada en la edición de esta tesis.*

*A **Pamela De Francesco** por su colaboración en la compaginación e impresión de los ejemplares.*

*Necesito agradecer profundamente a las personas que me ayudaron a transitar el trayecto más difícil de mi vida, acompañándome en el desafío diario que tuve que afrontar hace tres años, para vencer la adversidad: al personal de la clínica **Breast** de la ciudad de **La Plata**, secretarias, enfermeras y especialmente al **Dr. Luis A. Barbera** y al **Dr. Sergio Daniele**, al personal del **Centro Integrado de Oncología-Terapia Radiante CIO La Plata**, a la **Dra. Laura Suarez**, a la **Dra. Gabriela Lofiego**, a **Rubén Camelino**, a **Mauro Gonçalves**, a la **Lic. Karina Zabaleta**, a la **Lic. Leda Suarez**, a los doctores que formaron parte de las juntas médicas, a la organización **Lazo Rosa La Plata** y a la **Cámara Argentina de la Industria de Cosmética y Perfumería (CAPA)**, a los docentes y compañeros de la carrera de **Especialización Docente**, al grupo **Edificando en Cristo**.*

...porque hasta en lo más oscuro se puede encontrar una luz, y porque del más triste llanto se puede crear una sonrisa...

Agradecimientos

*Finalmente a la Facultad de Ciencias Exactas de La Universidad Nacional de La Plata, que mediante la realización del **Doctorado**, permitió que ampliara mis conocimientos, introduciéndome en el interesante camino de la investigación.*

Abreviaturas

| | |
|--|--|
| ADP | Adenosina 5'-difosfato |
| anti rGal-1h | Anticuerpo antigalectina-1 recombinante humana |
| anti Gal-1p | Anticuerpo antigalectina-1 porcino |
| anti Ta | Anticuerpo antitalina |
| ATP | Adenosina 5'- trifosfato |
| BSA | Sero-albúmina bovina |
| CA | Cromatografía de Afinidad |
| CDR | Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos |
| CE | Célula endotelial |
| CF | Citometría de flujo |
| cGMP | Monofosfato cíclico de guanosina |
| CIA | Cromatografía de Intercambio Aniónico |
| CMH | Células madre hematopoyéticas humanas |
| Col | Colágeno |
| DAMPs | Patrones Moleculares Asociados a Daños |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ECP | Extracto Citosólico Plaquetario |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetra-acético |
| ESAM | Molécula de Adhesión Selectiva de Células Endoteliales |
| Fb | Fibrinógeno |
| Fn | Fibronectina |
| FS | Fosfatidilserina |
| Gal-1 | Galectina-1 |
| Gal-1p | Galectina-1 esplénica porcina |
| rGal-1h | Galectina-1 recombinante humana |
| G₁, G_s, Gα_q y G$\alpha_{12/13}$ | Proteínas heterotriméricas G |
| GPs | Glicoproteínas |
| GPIIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) | Glicoproteína IIbIIIa |
| GP Ib-IX | Glicoproteína Ib-IX |

Abreviaturas

| | |
|------------------|--|
| IMB | Inmunoblotting |
| ITAM | Motivo del Inmunorreceptor basado en la Activación de Tirosina |
| ITIM | Motivo Inhibitorio dentro del Inmunorreceptor de Tirosina |
| MC | Megacariocito |
| MCp | Megacariopoyesis |
| MEC | Matriz extracelular |
| MEPBS | <i>Buffer</i> de fosfatos, pH 7,2, Na Cl 150mM |
| MO | Médula ósea |
| MP | Membrana Plaquetaria |
| MPs | Micropartículas |
| MS | Espectrometría de masa |
| NO | Monóxido de nitrógeno |
| PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida |
| PAMPs | Patrones Moleculares Asociados a Patógenos |
| PBS | <i>Buffer</i> fosfato salino, ClNa 150 mM |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PI3K | Fosfoinositol-3 quinasa |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKB (Akt) | Proteína quinasa B |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PKG | Proteína quinasa G |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PM | Peso molecular |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetil-sulfonilo |
| PPP | Plasma pobre en plaquetas |
| PRP | Plasma rico en plaquetas |
| PS | Proteína S |
| PSA | Persulfato de amonio |
| Pth | Plaquetas humanas |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| Pthl | Plaquetas humanas lavadas |
| Re | Receptor |
| rGal-1h | Galectina-1 recombinante humana |
| RP-HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa |
| SCA | Sistema canalicular abierto |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes |
| SE | Sangre Entera |
| STD | Sistema tubular denso |
| TBS | <i>Buffer</i> Tris salino |
| TF | Antígeno de Thomsen-Friedenreich |
| tPA | Activador tisular de plasminógeno |
| TPO | Trombopoyetina |
| Tr | Trombina |
| TSP | Trombospondina |
| TxA₂ | Tromboxano A ₂ |
| VEGF | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| Vn | Vitronectina |
| vWF | Factor de von Willebrand |

Las galectinas, previamente conocidas como lectinas de tipo S o S-Lac, son una familia filogenéticamente conservada que tienen homología de secuencias aminoacídicas y dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD). Todas las galectinas unen lactosa y otros oligosacáridos β -galactosídicos ejerciendo múltiples funciones. Se han identificado 15 galectinas de mamíferos, siendo designadas Gal-1 a la Gal-15. A través de estudios de localización de las galectinas se sabe que estas proteínas pueden secretarse en múltiples compartimentos celulares dependiendo del estatus celular. La Gal-1 pertenece a las galectinas *prototipo*, tiene un único CDR y puede formar homodímeros a través de interacciones no covalentes, lo que le confiere la habilidad de formar complejos multivalentes con glicoconjugados específicos en una amplia variedad de tejidos. La Gal-1 presenta una diversidad de comportamientos, presentando efectos estimulatorios o inhibitorios, de adhesividad o de anti-adhesividad, de proliferación o de inhibición de la proliferación, dependiendo del tipo celular, su estado de activación, expresión y su estado de glicosilación de receptores en su superficie, de la proporción monómero-dímero y de la distribución intra vs. extracelular. Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas de forma discoide que circulan en una concentración de 150 a 450 x 10⁹/L, formadas a partir de los megacariocitos como discos celulares pequeños que funcionan preservando la integridad del sistema vascular y sus acciones también están vinculadas con procesos complejos como inflamación y cáncer. Se sabe que aproximadamente el 15% del complejo GPIIb/IIIa plaquetario está compuesto por hidratos de carbono y que la interacción de la Gal-1 recombinante humana con plaquetas homólogas, provoca cambios conformacionales en los receptores GPIIb/IIIa los que favorecerían el fenómeno de activación. Debido a que la Gal-1 tiene un rol crucial en la homeostasis celular, inflamación y progresión tumoral, al igual que las plaquetas, y participa del funcionalismo plaquetario interaccionando a través de receptores/ligandos de la misma, nos propusimos purificar y caracterizar a la Gal-1 plaquetaria y plasmática humana, así como también establecer las interacciones con proteínas que participan en el funcionalismo de dichas células. En nuestro laboratorio, previamente demostramos que existía expresión de Gal-1 endógena en plaquetas en reposo, tanto por IFI como por CF. Para el aislamiento de Gal-1 de las plaquetas y del plasma humano, realizamos cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad en lactosa-agarosa. Encontramos que la Gal-1 plaquetaria co-purifica con actina, formando un complejo difícil de disociar. La presencia del complejo fue confirmada por *western blot* y por RP-HPLC-MS. Se estudió la actividad biológica de la Gal-1-actina mediante ensayos de hemoaglutinación utilizando glóbulos rojos de conejo tratados con neuraminidasa. A su vez, mediante microscopía confocal, se demostró que ambas proteínas co-localizaban tanto en plaquetas en reposo como en las activadas con Tr. Por otro lado, se realizaron estudios mediante IFI, para estudiar la interacción de Gal-1 con sus ligandos en plaquetas tanto en reposo como activadas con Tr y Gal-1, para dilucidar posibles interacciones con Ta y otras proteínas de la MEC. También purificamos la Gal-1 plasmática, pudiendo solo realizar la caracterización parcial de la misma. En base a nuestros resultados demostramos que la Gal-1 se encuentra en muy baja concentración en plaquetas humanas, coincidentemente con los estudios de proteómica previos. Proponemos que la Gal-1 podría generar un complejo interactivo con la actina, la Ta y otras proteínas de la MEC en las plaquetas humanas.

Palabras clave: Galectina; Plaquetas; Actina; Espectrometría de masa; Microscopia confocal; Hemoaglutinación; Talina; Inmunofluorescencia indirecta.

DURANTE EL TRANCURSO DE LA TESIS

Producción Científica

ARTICULOS

- **ERRASTI M.E., PROSPITTI A., VIANA C.A., GONZALEZ M.M., RAMOS V.R., ROTELLI A.E. AND CAFFINI N.O.** Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2016, 27:00–00.
- **GONZALEZ M.M.; YOSHIZAKI L.; WOLFENSTEIN-TODEL C.; FINK N.E.** Isolation of Galectin-1 from Human Platelets: Its Interaction with Actin. *PROTEIN JOURNAL*. Berlin: SPRINGER. 2012 vol.31 n°. p8 - 14. issn 1572-3887.
- **GONZALEZ M.M.; FINK N.E.** Recent studies on human platelets-galectin-1 interactions. *Journal of the Argentine Chemical Society*. Buenos Aires: ASOCIACION QUIMICA ARGENTINA. 2009 vol.97 n°. p234 - 241. issn 0365-0375.

TRABAJOS EN EVENTOS CIENTIFICO-TECNOLOGICOS PUBLICADOS

- **CHICAS K.L.; GIRARD BOSCH C.; GONZALEZ M.M.; FINK N.E.** Acción de la galectina 1 humana recombinante y liberación de gránulos densos en plaquetas homólogas. Argentina. Mar del Plata. 2013. Congreso. XXI Congreso Argentino de Hematología. Sociedad Argentina de Hematología.
- **FINK N.E.; GONZALEZ M.M.** Galectin-1 receptors in resting human platelets. Italia. Milan. 2013. Revista. Resumen. Congreso. 20th IFFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab). 45 th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC).SIBioC. IFFCC. EFLM.
- **GONZALEZ M.M.; TAPIA CADENA M.; FINK N.E.** Efecto de galectina 1 en plaquetas humanas en reposo y activadas con trombina sobre la captación -liberación de mepacrina por gránulos densos. Argentina. Buenos Aires. 2011. Revista. Resumen. Congreso. LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica- Reunión Sociedad Argentina de Fisiología- II Congreso Nacional AACYTAL- IV Reunión Científica Regional por el Bienestar del Animal de Laboratorio y el Progreso de la Ciencia. Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Producción científica y cursos realizados

- **ERRASTI M.E.; ROTELLI A.E.; GONZALEZ M.M.** Evaluación in vitro de la acción fibrinolítica y sobre la coagulación sanguínea de extractos de Bromeliaceas. Argentina. Tucumán. 2011. Revista. Resumen. Congreso. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Sociedad Argentina de Farmacología Experimental.
- **TAPIA CADENA M.; GONZALEZ M.M.; FINK N.E.** Efecto de la galectina-1 en la actividad funcional de plaquetas humanas. Argentina. Buenos Aires. 2011. Revista. Resumen. Congreso. XX Congreso Argentino de Hematología. Sociedad Argentina Hematológica.
- **SABBIONE, A.C.; GONZALEZ, M.M.; SCILINGO, A.A.; AÑÓN, M.C.** Empleo de pruebas globales de hemostasia para evaluar la potencial actividad antitrombótica de fracciones proteicas de semillas de amaranto y sus hidrolizados. Argentina. Buenos Aires. 2011. Revista. Resumen. Congreso. VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios - JIPCA VI. Comité organizador de las Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios.

Colaboración en realización de otras Tesis

- Colaboración en la realización de la Tesis de Maestría de la Lic. Karen Lorena Chicas dirigida por la Dra. Nilda Fink: **Acción de la galectina-1 recombinante humana sobre la liberación de gránulos densos en plaquetas humanas.** Período 2010-2013.
- Colaboración en la realización de la Tesis de Maestría de la Lic. Mercedes Tapia Cadena dirigida por la Dra. Nilda Fink: **Estudios ultraestructurales y por fluorescencia de plaquetas en reposo o activadas y adicionadas con galectina-1.** Período 2006-2010.

Cursos realizados

- **Curso de Formación docente. Curso Taller: *La enseñanza de las Ciencias de la Universidad. Viejos y nuevos problemas.*** Aprobado con evaluación final, apto para Doctorado, 2009. Carga horaria (horas): 50. Lugar de realización: UNLP. Facultad de Ciencias Exactas.
- **Curso de Fundamentos y Aplicaciones de Espectroscopías Vibracionales (Infrarrojo y Raman).** Aprobado con evaluación final, apto para Doctorado, 2013. Carga horaria (horas): 50. Dictado por la Dra. Rosana Romano en la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. CEQUINOR (UNLP-CONICET). Desde 2-12-13 hasta el 13-12-13.
- **IV Curso de Microscopía Electrónica de Transmisión Aplicado en Ciencias Biológicas.** Aprobado con evaluación final, apto para Doctorado, 2014. Carga horaria (horas): 30. Dictado por la Dra. Susana Jurado, organizado por el Servicio Central de Microscopía Electrónica (SCME). Facultad de Ciencias Veterinarias. Desde 2-07-14 hasta el 4-07-14.

Producción científica y cursos realizados

- **Curso a distancia de Hematología básica y especializada.** Aprobado con evaluación final, apto para Doctorado, 2014. Carga horaria (horas): 200hs. Organizado por el Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR). Directores del curso: Prof. Dra. Edita Solis y Dr. Sergio Chialina. Desde 11-08 hasta el 3-11-14.
- **Taller de Metodología de Investigación y Elaboración de Tesis, edición 2015. Area de Ciencias Exactas y Naturales.** Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. Dictado por la Dra. Gisela Lamas. Horas reloj: 40. Aprobado con evaluación final, nota: 10 (diez).

Contenido

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen

Producción científica y cursos realizados

1. Introducción

Sección 1: Galectina 1

1.1. Lectinas animales

1.1.1. Galectinas

1.1.1.1. Galectina-1

1.1.1.1.1. Gen

1.1.1.1.2. Estructura y localización de Gal-1

1.1.1.1.3. Síntesis y secreción

1.1.2. Ligandos de Gal-1

1.1.2.1. Interacción hidrato de carbono-proteína

1.1.2.2. Interacción proteína-proteína

1.1.3. Funciones biológicas de las galectinas

1.1.3.1. Las galectinas en el sistema inmunológico

1.1.3.2. Gal-1 y el desarrollo celular

1.1.3.3. Interacción de las galectinas con las plaquetas humanas

1.1.3.3.1. Interacciones galectina-plaqueta, potenciales reguladores de la inflamación, aterosclerosis y procesos metastásicos

1.1.3.3.2. Control de la angiogénesis por las galectinas involucradas en la liberación de factores proangiogénicos derivados de plaquetas

1.1.4. Gal-1 y cáncer

Sección 2: Plaquetas

1.2. Introducción

1.2.1. Definiciones

1.2.2. Formación de plaquetas

1.2.2.1. Trombopoyesis

Contenido

- 1.2.2.2. Biogénesis plaquetaria en médula ósea
- 1.2.2.3. Regulación humoral de la megacariopoyesis
- 1.2.2.4. Mecanismos de señalización involucrados en la megacariopoyesis
- 1.2.3. Morfología plaquetaria
 - 1.2.3.1. Membrana plaquetaria
 - 1.2.3.2. Sistema de membrana
 - 1.2.3.2.1. Sistema canalicular abierto
 - 1.2.3.2.2. Sistema tubular denso
 - 1.2.3.3. Gránulos de secreción
 - 1.2.3.3.1. Gránulos α
 - 1.2.3.3.2. Gránulos densos (cuerpos densos)
 - 1.2.3.3.3. Lisosomas
 - 1.2.3.3.4. Peroxisomas
 - 1.2.3.4. Citoesqueleto. Proteínas Motoras
- 1.2.4. Fisiología y bioquímica plaquetaria
 - 1.2.4.1. Activación plaquetaria
 - 1.2.4.1.1. Agonistas plaquetarios y sus receptores
 - 1.2.4.1.1.1. Introducción
 - 1.2.4.1.1.2. Clasificación
 - 1.2.4.1.1.2.1. Familia de las integrinas
 - 1.2.4.1.1.2.1.1. GPIIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)
 - 1.2.4.1.1.2.1.2. GPIaIIa ($\alpha_2\beta_1$)
 - 1.2.4.1.1.2.1.3. GPIc/IIa, GPI'c/IIa y receptor de vitronectina (Vn)
 - 1.2.4.1.1.2.2. Glicoproteínas ricas en leucina
 - 1.2.4.1.1.2.3. Otros receptores
 - 1.2.4.1.1.2. Mecanismos de activación: vías de transducción de señales
 - 1.2.4.1.2.1. Señalización de la activación plaquetaria mediada por los receptores de adhesión
 - 1.2.4.1.2.1.1. Señalización a través de la GPIb-IX
 - 1.2.4.1.2.1.2. Señalización a través de ITAM
 - 1.2.4.1.2.1.2.1. GPVI

Contenido

- 1.2.4.1.2.1.2.2. CLEC-2
- 1.2.4.1.2.2. Señalización de la activación plaquetaria mediada por receptores de reconocimiento de patrones
- 1.2.4.1.2.3. Señalización de la activación plaquetaria mediada por receptores acoplados a proteína G
 - 1.2.4.1.2.3.1. $G\alpha_q$
 - 1.2.4.1.2.3.2. $G\alpha_{12/13}$
 - 1.2.4.1.2.3.3. G_i y G_s
- 1.2.4.1.2.4. Sinergismo entre las diferentes vías de receptores de activación plaquetaria
- 1.2.4.1.2.5. Redes de amplificación de señales
 - 1.2.4.1.2.5.1. Fosfolipasa C (PLC), elevación de calcio y diacilglicerol
 - 1.2.4.1.2.5.2. Vía de la fosfoinositida 3-quinasa (PI_3K)-Akt
 - 1.2.4.1.2.5.3. Señalización a través de cGMP
 - 1.2.4.1.2.5.4. Secreción de gránulos como una señal de amplificación
 - 1.2.4.1.2.5.5. Señalización a través de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$
- 1.2.4.1.3. Respuestas funcionales
 - 1.2.4.1.3.1. Adhesión, cambio de forma, agregación y secreción
 - 1.2.4.1.3.2. Expresión de actividad procoagulante y formación de micropartículas
- 1.2.4.2. Proteínas plaquetarias
- 1.2.5. Actividades biológicas mediadas por plaquetas
 - 1.2.5.1. Actividades biológicas *funcionales*
 - 1.2.5.1.1. Hemostasia
 - 1.2.5.1.2. Modulación inmune producida por las plaquetas
 - 1.2.5.2. Actividades biológicas en *procesos patológicos*

2. Hipótesis y Objetivos

3. Esquema de Trabajo

4. Materiales y Métodos

- 4.1. Obtención de Gal-1 recombinante humana (rGal-1h)

Contenido

- 4.1.1. Transformación de bacterias competentes
 - 4.1.1.1. Transformación por shock térmico
 - 4.1.1.2. Selección
 - 4.1.1.3. Precultivo o cultivo semilla
 - 4.1.1.4. Inducción
- 4.1.2. Extracción y purificación de rGal-1h del cultivo
 - 4.1.2.1. Cosecha
 - 4.1.2.2. Sonicación
 - 4.1.2.3. Centrifugación
- 4.1.3. Purificación
 - 4.1.3.1. Separación cromatográfica
 - 4.1.3.2. Columna de polimixina
- 4.2. Caracterización bioquímica parcial de la rGal-1h
 - 4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 - 4.2.1.1. Tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue
 - 4.2.1.2. Tinción de los geles con coloración argéntica
 - 4.2.2. Immunoblotting
- 4.3. Obtención de anticuerpos policlonales antigalactina recombinante humana (anti-rGal-1h)
- 4.4. Purificación y caracterización de Gal-1 en plaquetas humanas
 - 4.4.1. Preparación de plaquetas humanas lavadas (Pthl)
 - 4.4.1.1. Plaquetas humanas sin leucodepleción
 - 4.4.1.2. Plaquetas humanas leucodeplecionadas
 - 4.4.1.3. Efecto del tiempo de almacenamiento plaquetario y otras variables
 - 4.4.2. Obtención del extracto citosólico plaquetario (ECP) y de las membranas
 - 4.4.2.1. Lisis de las membranas plaquetarias por congelamiento-descongelamiento
 - 4.4.2.2. Lisis de las membranas plaquetarias con un agente lisante
 - 4.4.3. Purificación de la galectina plaquetaria
 - 4.4.3.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico
 - 4.4.3.2. Cromatografía de afinidad
 - 4.4.3.3. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

Contenido

- 4.4.3.4. Almacenamiento y concentración de la glectina purificada
 - 4.4.3.4.1. En columnas de intercambio aniónico
 - 4.4.3.4.2. Dializada y Liofilizada
- 4.4.4. Caracterización bioquímica parcial de la glectina plaquetaria
 - 4.4.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 - 4.4.4.2. Inmunoblotting
 - 4.4.4.3. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria purificada
 - 4.4.4.3.1. Preparación de suspensiones globulares desializadas
 - 4.4.4.3.2. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante
 - 4.4.4.4. Análisis de la glectina obtenida por RP-HPLC-MS
 - 4.4.4.4.1. Digestión enzimática y análisis por RP-HPLC-MS
 - 4.4.4.4.1.1. Digestión enzimática en gel
 - 4.4.4.4.1.2. Digestión enzimática en solución
- 4.5. Estudio de la co-localización de la Gal-1 y actina en plaquetas humanas por Microscopía Confocal (MC)
 - 4.5.1. Preparación de Pthl para los ensayos de MC
 - 4.5.2. Co-localización de Gal-1 y actina en Pthl por MC
- 4.6. Estudio de la interacción de Gal-1 con otras proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas por IFI
 - 4.6.1. Preparación de Pthl para realizar los ensayos de IFI
 - 4.6.2. Patrón de localización de talina y actina en Pthl en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1, por IFI
- 4.7. Estudio de receptores/ligandos de Gal-1 en lisados de membrana de plaquetas humanas
 - 4.7.1. Inmovilización de la Gal-1
 - 4.7.2. Enriquecimiento del receptor/ligando a partir del lisado de membranas plaquetarias producido por la interacción con Gal-1
- 4.8. Purificación y caracterización de Gal-1 en plasma pobre en plaquetas (PPP)

Contenido

5. Resultados

5.1. Obtención de Gal-1 recombinante humana

5.1.1. Transformación bacteriana

5.1.1.1. Transformación por shock térmico

5.1.1.2. Selección

5.1.1.3. Precultivo

5.1.1.4. Inducción

5.1.2. Extracción y purificación de rGal-1h del cultivo

5.1.2.1. Cosecha

5.1.2.2. Sonicación

5.1.2.3. Centrifugación

5.1.3. Purificación de la rGal-1h

5.1.3.1. Columna de afinidad

5.1.3.2. Columna de polimixina

5.2. Caracterización bioquímica parcial de la rGal-1h

5.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

5.2.2. Inmunoblotting

5.3. Obtención de anticuerpos policlonales antigalectina 1 recombinante humana

5.4. Purificación y caracterización de Gal-1 en plaquetas humanas

5.4.1. Preparación de plaquetas humanas lavadas

5.4.1.1. Plaquetas humanas sin leucodepleción

5.4.1.2. Plaquetas lavadas leucodeplecionadas

5.4.1.3. Efecto del tiempo de almacenamiento plaquetario y otras variables

5.4.2. Obtención del extracto citosólico y de las membranas plaquetarias

5.4.2.1. Lisis de las membranas plaquetarias por congelamiento-descongelamiento

5.4.2.2. Lisis de las membranas plaquetarias con un agente lisante

5.4.3. Purificación de la galectina plaquetaria

5.4.3.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico

5.4.3.2. Cromatografía de afinidad

5.4.3.3. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

5.4.3.4. Almacenamiento y concentración de la galectina purificada

Contenido

- 5.4.3.4.1. En columnas de intercambio aniónico
- 5.4.3.4.2. Liofilizada
- 5.4.4. Caracterización bioquímica parcial de la galectina plaquetaria
 - 5.4.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida
 - 5.4.4.2. Inmunoblotting
 - 5.4.4.3. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria purificada
 - 5.4.4.4. Análisis de la galectina obtenida por RP-HPLC-MS
 - 5.4.4.4.1. Digestión enzimática y análisis por RP-HPLC-MS
 - 5.4.4.4.1.1. Digestión enzimática en gel
 - 5.4.4.4.1.2. Digestión enzimática en solución
- 5.5. Estudio de la co-localización de la Gal-1 y actina en plaquetas humanas por Microscopía Confocal (MC)
 - 5.5.1. Preparación de Pthl para los ensayos de MC
 - 5.5.2. Co-localización de Gal-1 y actina en Pthl por MC
- 5.6. Estudio de la interacción de Gal-1 con otras proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas por IFI
 - 5.6.1. Preparación de Pthl para realizar los ensayos de IFI
 - 5.6.2. Patrón de localización de Ta y Gal-1 en Pthl en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1, por IFI
- 5.7. Estudio de receptores/ligandos de Gal-1 en lisados de membrana de plaquetas humanas
 - 5.7.1. Inmovilización de la Gal-1
 - 5.7.2. Enriquecimiento del receptor/ligando a partir del lisado de membranas plaquetarias producido por la interacción con Gal-1
- 5.8. Purificación y caracterización de la Gal-1 en plasma pobre en plaquetas (PPP)

6. Discusión general y conclusiones

7. Bibliografía

1. Introducción

Sección 1: Galectina-1

1.1. Lectinas animales

Las lectinas son un grupo especial de proteínas que interactúan selectivamente con estructuras de azúcares específicos sin modificar su naturaleza biológica, teniendo la capacidad de unir carbohidratos, monosacáridos u oligosacáridos simples (Barondes, 1981).

A fines del siglo XX fueron clasificadas en cinco familias de acuerdo a su estructura primaria:

- **Lectinas tipo C:** tienen un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (CDR) conservado y la unión al carbohidrato es variable (manosa, galactosa, fucosa, tetrasacárido de heparina) y dependiente de calcio.
- **Lectinas tipo I:** tienen un CDR similar a las inmunoglobulinas y la unión a carbohidrato es variable (Man6GlcNAc2, epítopo HNK-1, ácido hialurónico, α 2, 3/ α 2,6-sialilactosa).
- **Galectinas tipo S:** tienen un CDR conservado y la unión es a carbohidratos β -galactosídicos.
- **Lectinas tipo P:** el CDR es una subunidad pentamérica, la unión a carbohidratos es variable (4,6-acetal cíclico de β -galactosa, galactosa, monosacáridos sulfatados y fosforilados)
- **Pentraxinas:** el sitio de reconocimiento a carbohidratos es similar a un CRD, pero no se puede definir estrictamente como tal. La unión a carbohidratos se realiza a través de glicoproteínas que contienen manosa-6-fosfato.

A partir del siglo XXI, varios trabajos de Crocker *et al.* estudiaron las lectinas de tipo I y las denominaron *Siglecs* (inmunoglobulinas que unen ácido siálico unidas a lectinas, conocidas comúnmente como lectinas tipo I); estudiándolas sobre la superficie de varias líneas celulares, las encontraron finalmente tanto en la superficie de células del sistema inmune como del sistema hematopoyético (Crocker *et al.*, 2014; Cagnoni *et al.*, 2016) (**Fig. 1.1**). Previamente fueron clasificadas como lectinas de tipo I, debido a que contenían una inmunoglobulina homóloga unida al dominio, pero actualmente forman dos grupos distintos: **(1)** un grupo conservado evolutivamente consistente en *sialoadhesina/Siglec-1*, *CD22/Siglec-2* y una *glicoproteína asociada a mielina/MAG/Siglec-4* y **(2)** *siglecs relacionadas con CD33/Siglec-3* y *Siglec-5 a -13*.

Introducción

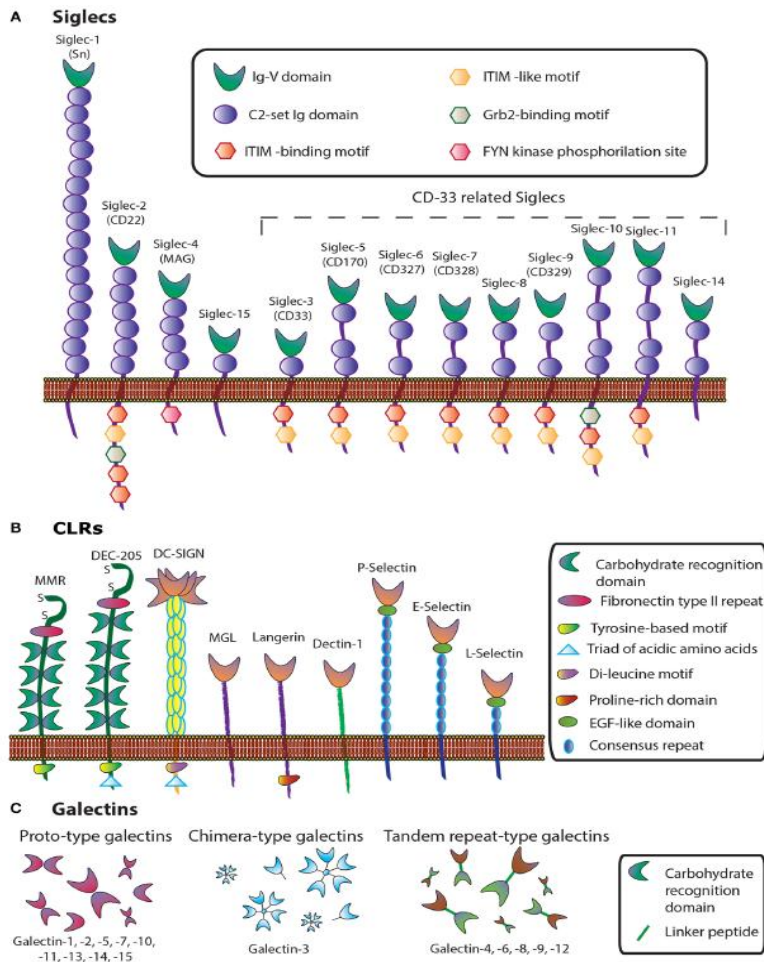


Figura 1.1. Representación esquemática de las tres familias de lectinas A) Siglecs, (B) Lectinas tipo C, y (C) Galectinas. Tomado de Cagnoni *et al.*, 2016.

Las lectinas *Siglecs* son expresadas primariamente en células B, macrófagos, células dendríticas (DCs), y eosinófilos, estando implicadas tanto en la inmunidad innata como adaptativa. A su vez, las *Siglecs* están involucradas en la señalización celular y la adhesión, y se supone que participan en el reconocimiento de patógenos y en la endocitosis (**Fig. 1.1**). Por lo tanto juegan un rol importante en las interacciones patógeno-huésped, comunicación célula-célula, y regulación de la tolerancia inmune, manteniendo la homeostasis inmune y regulando los procesos inflamatorios (Thijssen *et al.*, 2015).

Introducción

Los receptores de lectina de tipo C (dependientes del calcio) (CLR) son la más grande y variada familia de lectinas de animales. Sus dominios de reconocimiento a carbohidratos son típicos de ligandos de unión a azúcares, ligándolos a iones Ca^{2+} . La diversidad del grupo de lectinas de tipo C comprende receptores endocíticos, selectinas, colectinas y proteoglicanos, tanto de tipo de secreción como de transmembrana. El grado de conservación varía en toda la familia; los receptores para la adhesión y endocitosis de los glicanos endógenos en mamíferos se conservan a menudo, mientras que la unión a receptores de patógenos en las células inmunes muestran más variabilidad (Drickamer & Taylor, 2015).

Además de su función en la adhesión celular y el metabolismo de las glicoproteínas, las lectinas de tipo C también participan fuertemente en la respuesta inmune y el reconocimiento de patógenos (Dambuza & Brown, 2015) (**Fig. 1.1**).

Se demostró que los patógenos y los antígenos tumorales utilizan las CLR para evadir el reconocimiento del sistema inmune del huésped, evitando así su degradación. La comunicación de CLR y receptores tipo Toll de células dendríticas se realiza al inicio de la respuesta inflamatoria, manteniendo la tolerancia por el sistema de defensa. Así, las CLR son capaces de modificar las vías de señalización activadas por los receptores Toll-like. Este comportamiento se observa típicamente en DC-SIGN (molécula ramificada de adhesión intercelular específica-3 de células, no integrina) y el receptor de galactosa de macrófagos (MGL), una nueva vía hacia la terapéutica antiviral y anticancerígena (Napoletano *et al.*, 2012).

Por otro lado, *las Galectinas* son una familia de lectinas solubles unidas a glicanos altamente conservadas, que se caracterizan por poseer un dominio de reconocimiento de carbohidratos conservado (CDR) y un pliegue estructural común (**Fig. 1.1**) (Cagnoni *et al.*, 2016).

1.1.1. Galectinas

Los miembros de la familia de las galectinas (Gal) son una familia de lectinas solubles. Cada molécula de galectina contiene en su estructura al menos un dominio de alrededor de 135 aminoácidos, responsable de la propiedad de unión de carbohidratos, CDR. Se han caracterizado hasta el momento 15 galectinas en los mamíferos, numeradas según la cronología del descubrimiento (Gal-1 a Gal-15).

Introducción

Mediante estudios de la estructura primaria, se encontró un 29% de identidad de secuencia entre los CDRs de las galectinas humanas (Guardia *et al.*, 2011).

Por otro lado, la identidad de secuencia entre la misma galectina en distintas especies de mamíferos asciende a un 80-90%, demostrando que estas proteínas se encuentran altamente conservadas (Barondes *et al.*, 1994b).

Además, mediante estudios de cristalografía de rayos X y experimentos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear se ha descrito la estructura de algunos miembros de esta familia, como por ejemplo, de las Gal -1, -3, -8 y -9. Por lo tanto, de acuerdo a sus características estructurales, *las galectinas se clasifican en tres grupos* (Barondes *et al.*, 1994a; Barondes *et al.*, 1994b; Hirabayashi & Kasai, 1993) (**Fig. 1.1 y Fig.1.2**):

1. **Galectinas prototipo**: contienen un único CDR y reconocen estructuras simples de disacáridos. Son capaces de asociarse formando homodímeros mediante interacciones no covalentes. Están incluidas 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).

2. **Galectinas tipo chimera**: la galectina 3 es el único miembro de esta familia; contiene un único CDR en el C-terminal y un dominio N-terminal atípico no lectínico que está involucrado en la oligomerización de la lectina, formando trímeros o pentámeros.

3. **Galectinas tipo tandem repeat**: contienen dos CDR estructuralmente diferentes en tándem conectados por un péptido. Son naturalmente bivalentes, aunque cada CDR pueda reconocer estructuras sacarídicas sutilmente diferentes. Pertenecen a este grupo las Galectinas 4, 6, 8, 9 y 12.

Se descubrió que la interacción glicoproteína-galectina produce enrejados que transducen señales celulares, modulan el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. Por otro lado, también modulan las interacciones célula-célula, célula-matriz y patógenos-célula. También se sabe que los entrecruzamientos glicoproteína-galectinas regulan el turnover del receptor y la supervivencia y señalización celular, siendo controlados por el grado de ramificación de los N-glicanos, los cuales participarían de la modulación del turnover y señalización del receptor. La sialización diferencial sobre

Introducción

las glicoproteínas de la superficie celular influencia selectivamente la formación de entrecruzamientos glicoproteínas-galectinas en diferentes células T-helper, así como también la Gal-1 regula la susceptibilidad para inducir la muerte celular (Thijssen *et al.*, 2015) (**Fig. 1.2**).

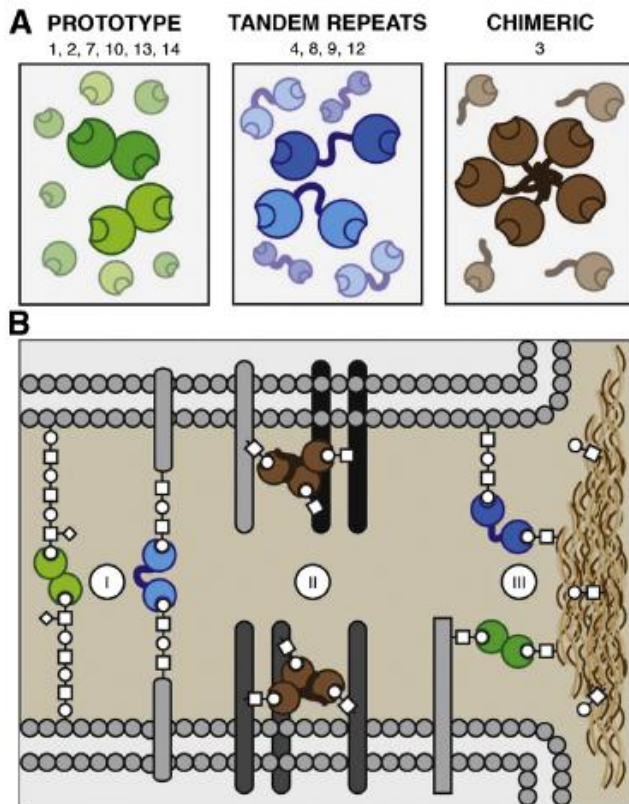


Figura 1.2. Familia de las galectinas humanas y sus funciones. A) Esquema de los tres grupos diferentes de galectinas B) Esquema de las funciones extracelulares más comunes de las galectinas. La dimerización y multimerización permite a las galectinas unirse simultáneamente a múltiples glicoconjugados. De esta manera las galectinas pueden (I) mediar interacciones célula-célula homo y heterotípicas, (II) estimular o prolongar la señalización por el agrupamiento de receptores en la superficie celular y (III) mediar las interacciones matriz extracelular-célula. Tomado de Thijssen *et al.*, 2015.

Su distribución en los tejidos de los mamíferos es variada. Mientras Gal-1 y -3 se detectan de forma ubicua, otras galectinas se encuentran más específicamente distribuidas, tal como Gal-2 y -4, que se encuentran preferentemente en el tracto gastrointestinal, en tanto que Gal-7 es muy abundante en la piel, Gal-10 en eosinófilos y Gal-12 en el tejido adiposo (Yang *et al.*, 2004).

1.1.1.1. Galectina-1

La *Galectina-1 (Gal-1)* fue el primer miembro de la familia de las galectinas descubierto. Pertenece a las galectinas *prototipo*, tiene un único CDR y puede formar homodímeros a través de interacciones no covalentes, lo que le confiere la habilidad de formar complejos multivalentes con glicoconjugados específicos (Liu & Rabinovich, 2005).

Introducción

1.1.1.1.1. Gen

El gen *LGALS1* (*lectin galactoside binding soluble 1*) localizado en el cromosoma 22q12 codifica para la proteína Gal-1, con un peso molecular aproximado de 14 kDa (Camby *et al.*, 2006).

Se sabe que el estado de metilación del promotor es un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica de Gal-1 (Barrientos *et al.*, 2014) (**Fig.1.3.A**). Además, varios factores de transcripción están implicados en la expresión de Gal-1, como el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en células de cáncer colorectal (Zhao *et al.*, 2010), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) en células T (Toscano *et al.*, 2011) y en sarcoma de Kaposi (Crocì *et al.*, 2012), la proteína activadora 1 en células Reed-Stenberg de linfoma de Hodgkin (Juszczynski *et al.*, 2007) y la proteína α de unión a la secuencia reguladora CAAT en leucemia mieloide aguda (Zhao *et al.*, 2011).

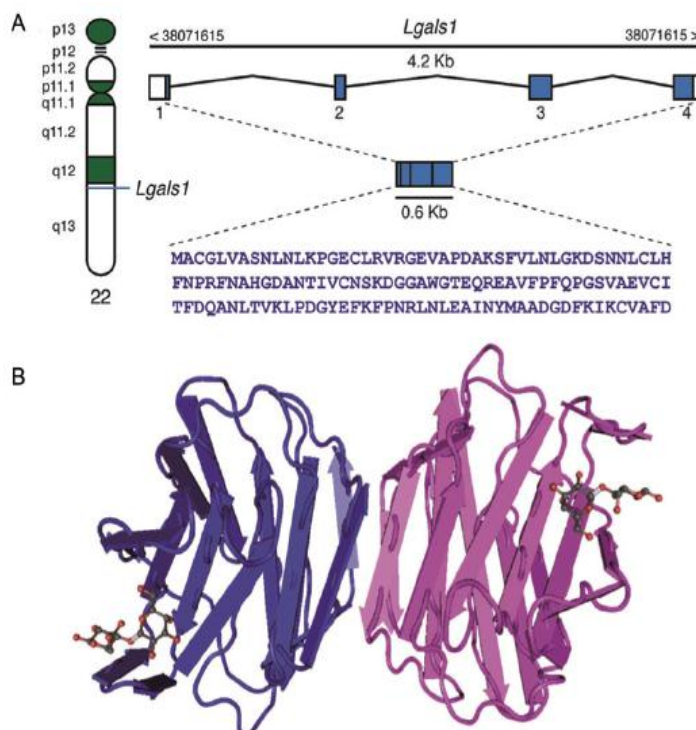


Figura 1.3. Estructura genética y proteica de Gal-1. (A) El mapa del locus de *Lgals1* en el cromosoma humano 22q12 que comprende 4.2 kb. La unión de cuatro exones (1-4) da lugar a una transcripción de 0,6 kb que codifica una proteína de 135 aminoácidos. (B) Gal-1 se encuentra en solución como una forma homodimérica mantenido por interacciones no covalentes que implican los extremos N y C de sus subunidades (representado en azul y rosa). Cada monómero contiene la estructura del CRD compuesta de cinco y seis cadenas plegables de β hojas antiparalelas dispuestas en un β -sándwich. Los CRD se ilustran en la figura como sitios de unión en cada monómero (Galb1-4Glc). CRD es el dominio de reconocimiento de carbohidratos. **Tomado de Barrientos *et al.*, 2014.**

1.1.1.1.2. Estructura y localización de Gal-1

La Gal-1 existe como un homodímero en solución y la integridad del mismo se mantiene principalmente por interacciones que ocurren en la interfase entre los monómeros y a través del núcleo o centro hidrofóbico. Cada subunidad tiene un PM de aproximado de 14,5 kDa. Pertenece al grupo de galectinas *proto-type*. La Gal-1 contiene un CDR formado por 11 hebras β dispuestas en hoja β sándwich paralelas. Seis de estas cadenas β , de S1 a S6, forman la cara cóncava del CDR, donde se une el ligando, mientras que las cinco restantes (F1 a F5) forman la otra cara (Camby *et al.* 2006; Romero *et al.*, 2016).

El N y C terminal de cada monómero se colocan en la interfase del dímero y los CDR están situados en los extremos terminales de la misma cara; esta configuración forma un bolsillo con cargas negativas en el interior de la cavidad (Barrientos *et al.*, 2014). (**Fig. 1.3.B**).

Se sabe que la estructura del CDR de Gal-1 se encuentra altamente conservada en los vertebrados a lo largo de la evolución. A su vez, una de las principales características del homodímero es su espontánea disociación a bajas concentraciones (K_d 7 μ M) hacia la forma monomérica, que también es capaz de unirse a carbohidratos, pero con menor afinidad (Leppanen *et al.*, 2005).

Por otro lado, cada monómero de Gal-1 posee seis residuos de cisteína, lo que le confiere una fuerte sensibilidad a la oxidación. Los residuos de cisteína deben estar en estado reducido para mantener la estructura molecular con actividad de lectina, dado que en estado oxidado carece de dicha actividad. Durante la oxidación se forman tres puentes disulfuro en la estructura de Gal-1, produciéndose un cambio conformacional que impide la dimerización y el reconocimiento de glicanos (Pande *et al.*, 2003). La presencia de ligandos de Gal-1 desplaza el equilibrio monómero-dímero favoreciendo la dimerización y protegiendo a la Gal-1 de la oxidación (Stowell *et al.*, 2009).

La Gal-1 se expresa en diferentes tejidos/órganos humanos, incluyendo timo (Baum et al., 1995), colon (Hittlet et al., 2003), bazo (Ahmed et al., 1996), músculo liso (Moiseeva et al., 2000), ovario (van den Brule et al., 2003), sistema nervioso (Akazawa et al., 2004), pulmón (Gitt & Barondes, 1986) y línea celular de hepatoma HepG2 (Abbott & Feizi, 1989). A su vez, 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 (Iglesias et al., 1998) y testículo (Dettin et al., 2003). En bovino, se dispone de la secuencia completa de las Gal-1 de corazón y de la línea celular de

fibroblastos EBTr (Abbot & Feizi T., 1989) y de bazo (Schwarz *et al.*, 1998). Otras galectinas secuenciadas son las de pulmón de rata (Clerch *et al.*, 1988), cerebro (Hynes *et al.*, 1990) y corazón de cerdo (Merkle *et al.*, 1989).

Se han observado perfiles diferentes de expresión de lectinas en células cancerígenas, comparados con células normales (Liu & Rabinovich, 2005). En varios trabajos se ha demostrado un incremento en la expresión de Gal-1 en diferentes tumores, entre ellos astrocitomas (Camby *et al.*, 2001), melanomas (Rubinstein *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 *et al.*, 1999). Este punto será ampliado en la sección 1.1.4.

1.1.1.1.3. Síntesis y secreción

*La Gal-1 tiene características de una proteína citoplasmática, con un extremo amino acetilado y carece de glicosilaciones. Sin embargo, su expresión se describió en el núcleo y citoplasma, así como también en la cara intracelular de la membrana plasmática. Aunque Gal-1 carece de una secuencia señal de secreción y no atraviesa la vía clásica del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, es secretada y se la puede encontrar en la cara extracelular de las membranas plasmáticas, así como en la matriz extracelular (MEC) de varios tejidos normales y neoplásicos (Camby *et al.*, 2006).*

La primera vez que se describió la secreción de Gal-1 fue en el año 1990, en células de músculo esquelético (Cooper & Barondes, 1990), pero los mecanismos subyacentes permanecieron desconocidos, hasta que el grupo de Nickel demostró que la secreción de Gal-1 de células de mamíferos involucra una translocación directa a través de la membrana plasmática, que requiere de proteínas integrales de membrana y factores citosólicos no identificados. El sitio de unión a glicanos podría ser el primer motivo que dirija la exportación utilizando moléculas de superficie que contengan β -galactósidos como receptores para Gal-1 intracelular (Nickel, 2005).

1.1.2. Ligandos de Gal-1

En la actualidad muchos ligandos han sido descritos para la Gal-1, los cuales median las interacciones conocidas hidrato de carbono-proteína (azúcar-lectina), pero se ha descubierto también que interactúa como proteína-proteína (proteína-lectina).

La actividad de la Gal-1 a través de la unión con hidratos de carbono se observa en el espacio extracelular, mientras que las interacciones proteína-proteína desencadenan funciones intracelulares. Dichas interacciones se detallan a continuación.

1.1.2.1. Interacción hidrato de carbono-proteína

La actividad de la Gal-1 como lectina se relaciona con el sitio de unión al hidrato de carbono (CDR) (**Fig. 1.3.B**). La unión del azúcar es favorecida entálpicamente, apoyando la idea de que fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno constituirían las principales fuerzas que impulsarían y/o estabilizarían estas formaciones complejas (López-Lucendo *et al.*, 2004).

Se sabe que entre las interacciones hidrato de carbono-proteína intervienen receptores de la matriz extracelular (MEC) y/o de la superficie celular. La MEC se ha estudiado mediante métodos inmunohistoquímicos, los cuales demuestran que está enriquecida en Col tipo I, III, V y VI, Vn, Fn, Fb/fibrina, osteopontina y TPS. Algunas de las proteínas mencionadas proceden de fuentes externas: por ejemplo, Fn y Vn se encuentran en sangre periférica, otras como la TPS es secretada por las plaquetas activadas, así como el Fb, que pasa a fibrina y se deposita luego de la trombosis local.

La Gal-1 se une a un número de componentes de la MEC en forma dosis-dependiente y de manera β -galactosídica dependiente en el siguiente orden: laminina > Fn celular > TPS > Fn plasmática > Vn > osteopontina (Moiseeva *et al.*, 2000; Moiseeva *et al.*, 2003a), siendo la laminina y la Fn los principales ligandos de Gal-1 (van den Brule *et al.*, 2003).

Por otro lado, se sabe que la Gal-1 es abundante en la MEC de la pared vascular normal; la modulación de su expresión en diversas condiciones fisiológicas influye en sus propiedades, por ejemplo, inhibe la incorporación de Vn y condroitin sulfato B a la MEC de células musculares lisas vasculares. Este hecho sugiere una función de Gal-1 en el diseño y remodelación de la MEC (Moiseeva *et al.*, 2003a).

Introducción

También se ha informado una sobreexpresión del gen de Gal-1, junto a los genes que codifican para las proteínas de MEC, en el aneurisma cerebral; dicho hallazgo podría estar relacionado con la función que desarrolla la Gal-1 en la formación de la MEC durante la cicatrización de heridas y la reconstrucción de los tejidos (Moiseeva *et al.*, 2003a).

La mayoría de los ligandos identificados de unión extracelular para Gal-1 son glicoconjugados ricos en el disacárido N-acetil-lactosamina. La disposición de los disacáridos de lactosamina en cadenas ramificadas repetidas son responsables de la alta avidéz por la lectina, pero también es posible la unión de la Gal-1 a la lactosamina sola, aunque con niveles relativamente bajos de afinidad (Ahmad *et al.*, 2004).

Varias glicoproteínas de membrana fueron identificadas como proteínas que unen Gal-1, permitiendo la interacción entre célula-célula o la adhesión entre célula-MEC. Las integrinas son receptores heterodiméricos para moléculas de adhesión de la superficie celular y proteínas de la MEC. Se unen a ligandos de una forma afinidad/avidéz dependiente y su interacción está influenciada por la capacidad de unión y la conformación del ligando. Por lo tanto, los diferentes ligandos o las diferentes formas de un mismo ligando pueden transmitir distintas señales celulares a través de una misma integrina (Stupack & Cheresch, 2002a y b).

A su vez, se han descrito numerosas variantes de integrinas y glicofomas relacionadas con la Gal-1, en numerosos tipos celulares normales y patológicos (Moiseeva *et al.*, 2003b). Por otro lado, se sabe que Gal-1 se une a un conjunto de glicoproteínas de la superficie celular de mamíferos, y que sólo las que participan en la apoptosis inducida por Gal-1 son CD45, CD43 y CD7 (Earl *et al.*, 2010). A su vez, se sabe que la Gal-1 es el principal receptor de la porción de hidrato de carbono expuesta del gangliósido GM1 en la superficie de células de neuroblastoma humano (Andre *et al.*, 2004) y que actúa como regulador del crecimiento negativo de dichas células (Kopitz *et al.*, 2001).

Es importante destacar que la avidéz de la unión de la Gal-1 dimérica mejora cuando sus ligandos ramificados están unidos a la superficie como en las membranas celulares o en la MEC (Leppanen *et al.*, 2005).

Se sabe que Gal-1 media la agregación homotípica de las células cancerígenas a través de interacciones multivalentes con glicoconjugados de la superficie celular en una variedad de tipos de células (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la Gal-1 induce la

Introducción

agregación homotípica en células de melanoma humano (A375). Se observó que la Gal-1 se unía bivalentemente a la glicoproteína de superficie celular 90K/Mac-2BP en la superficie adyacente, promoviendo la agregación celular. La Mucina 1 es otro posible receptor de la Gal-1 a la superficie celular. Es una gran proteína transmembrana que está sobreexpresada y aberrantemente glicosilada con el antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF) (Gal 1-3GalNAc disacárido) en muchas células cancerosas (Jeschke *et al.*, 2009).

Se conoce que la Gal-1 se une al antígeno TF, conjugándolo con una poliacrilamida (TF-PAA), que se fija a la Gal-1 para ser monitoreado mediante agregación celular utilizando una línea celular de carcinoma coriónico (BeWo), que expresa Mucina 1. A su vez, la adhesión expone moléculas que interactúan con moléculas de adhesión en células vecinas para agregar células. Tanto Gal-1 como Gal-3 se unen al antígeno TF a través de la Mucina 1, por lo que es probable que la Gal-1 multivalente medie la agregación celular mediante la unión reticulada de las células adyacentes y la exposición de moléculas de adhesión a través del agrupamiento de la Mucina 1. Por otro lado, mediante microscopía confocal se ha observado la interacción de la Gal-1 con el antígeno TF en células de cáncer de mama MDA-MB-435, demostrando la acumulación de Gal-1 en la interface entre las células cancerosas. Dicha agregación fue inhibida por el péptido P-30, inhibidor específico del antígeno TF, indicando que la Gal-1 se unía al TF mediando la agregación homotípica. También se sabe que la unión multivalente del antígeno TF por galectinas agrupa a la Mucina 1 en la superficie celular, lo que facilita la agregación celular mediante la exposición de varias moléculas de adhesión. Por lo tanto, estos trabajos indican que las interacciones multivalentes de la Gal-1 con glicoconjugados de la superficie celular (por ejemplo, Mucina 1) mediarían la agregación a través de la reticulación celular (**Fig. 1.4**) (Cousin & Cloninger, 2016).

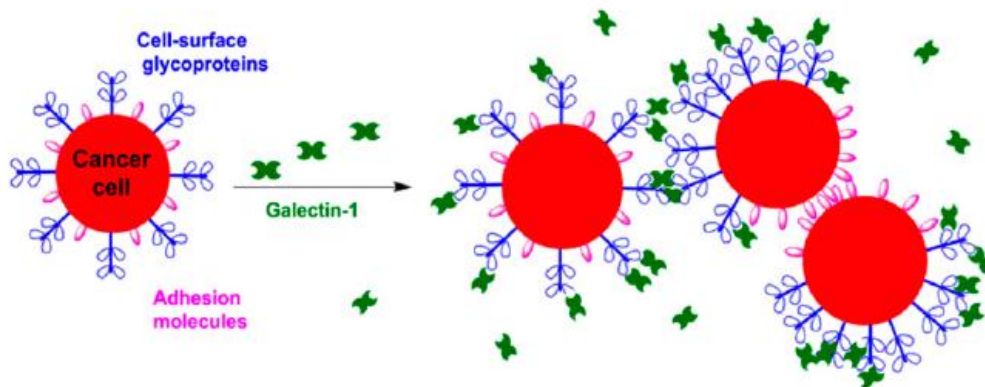


Figura 1.4. Gal-1 media la agregación homotípica de células cancerígenas a través de interacciones con glicoproteínas de la superficie celular. Tomado de Cousin & Cloninger, 2016.

La inhibición de la agregación de células cancerígenas *in vitro* fue demostrada usando dendrímeros unidos a lactosa. La Gal-1 interacciona con los glicodendrímeros, los que desestabilizan los procesos descritos en la **Fig. 1.4**. Los glicodendrímeros nuclean la formación de agregados Gal-1/glicodendrímeros que no tienen efectividad en la formación de los enrejados de células cancerígenas. Los estudios de fluorescencia indican que la unión multivalente de la Gal-1 reorganizada por la Mucina en la superficie celular es disrumpida por la presencia de glicodendrímeros. Estos estudios sostienen la hipótesis de que la Gal-1 interaccionaría multivalentemente para agregar las células cancerígenas. A su vez, los mecanismos proadhesivos se producen por la Gal-1, que mediaría los entrecruzamientos de las proteínas de la MEC y los glicoconjugados de la superficie celular. Estos estudios sugieren que una de las actividades de la Gal-1 es modular la adhesión de células sanguíneas durante la metástasis. Se sabe que la Gal-1 inhibe las interacciones célula-MEC por competitividad de unión a glicoproteínas de la matriz o de glicoconjugados de la superficie celular, produciendo una regulación negativa de la adhesión de las células a la MEC (**Fig. 1.5.b**) (Cousin & Cloninger, 2016).

Por otro lado, se observó que la Gal-1 exógena inhibía tanto la adhesión como la migración, sobre las placas revestidas por laminina. Similares propiedades anti-adhesivas fueron observadas con otros tipos de células en presencia de Gal-1 exógena. Estos estudios sugirieron otra función para la Gal-1, la modulación del desprendimiento de células tumorales, permitiendo de esta manera que las células tumorales viajen a un sitio secundario. Por lo tanto, se demuestra que la Gal-1 se une a las glicoproteínas arbitrarias de la MEC participando tanto en la adhesión como en el desprendimiento de

Introducción

las células cancerosas. En consecuencia, los posibles factores que explican la actividad bifásica podrían ser: (i) expresión de ligandos de glicoconjugado dependientes del tipo de células para Gal-1, (ii) expresión de receptores dependientes del tipo de célula para proteínas MEC que influyen en la unión a Gal-1, (iii) coexpresión de galectinas múltiples que exhiben propiedades antagonistas y (iv) cambios en los niveles de expresión y/o oligomerización de Gal-1 (Elola *et al.*, 2007).

Se muestra esquemáticamente en la **Fig.1.5** cómo los cambios en la valencia efectiva de Gal-1 podrían afectar significativamente la adhesión a la MEC (Cousin & Cloninger, 2016).

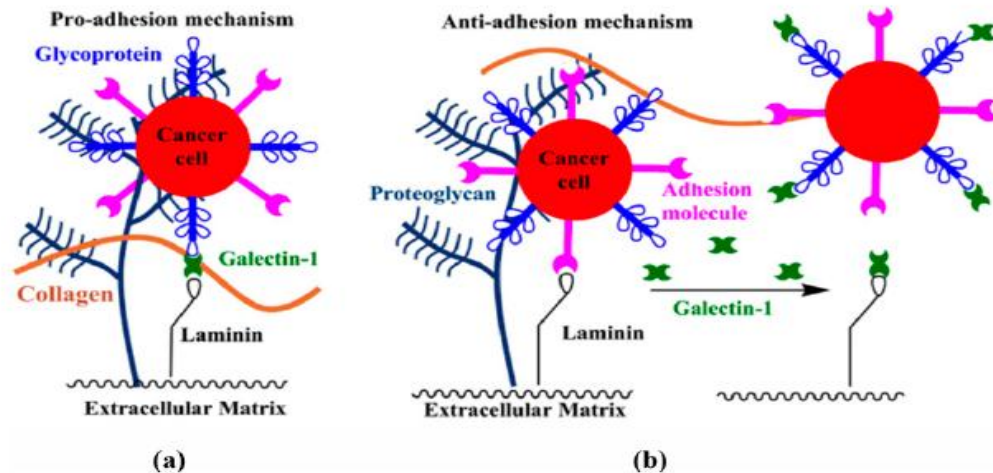


Figura 1.5. Arbitraje bifásico de las interacciones célula-matriz extracelular (MEC) por Gal-1. (a) Gal-1 media la reticulación de los glicoconjugados de la superficie celular y de las glicoproteínas ECM promoviendo la adhesión; y (b) la unión competitiva a las glicoproteínas ECM por Gal-1 inhibe la adhesión y promueve diseminación de las células tumorales. Tomado de Cousin & Cloninger, 2016.

Por otra parte, en células endoteliales de cordón umbilical humano Gal-1 interactúa con neuropilina-1 (NRP1), con la molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM o MUC 18 o CD146) y con el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2 (VEGFR2), modulando la migración celular, la apoptosis y la angiogénesis (Crocì *et al.*, 2014a).

1.1.2.2. Interacción proteína-proteína

La Gal-1 intracelular actúa como una proteína soporte para las vías de señalización intracelular de forma carbohidrato independiente. En relación con la biología de las células cancerosas, la Gal-1

Introducción

intracelular participa en las interacciones proteína-proteína con H-Ras, protocadherina-24, y Geminina-4 de manera carbohidrato independiente (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

Por otro lado, se sabe que las proteínas no están estructuralmente relacionadas y no parecen compartir dominios o motivos. A su vez, la Gal-1 está involucrada en procesos fundamentales como el procesamiento del ARNm. Existen varias evidencias que indican que la Gal-1 y la Gal-3 son dos de las muchas proteínas implicadas en el empalme nuclear de pre-mRNA. Dichas revelaciones se llevaron a cabo estudiando la formación del producto en un gel desnaturizante o sobre geles no desnaturizantes o nativos, revelando los intermediarios que participarían del montaje del spliceosoma (Patterson *et al.*, 2015).

También se sabe que el receptor de células Pre-B (Pre-BCR) es un ligando de Gal-1 secretado por las células estromales de MO, que interacciona con Gal-1 de manera independiente del CDR. El Pre-BCR posee una cadena liviana λ (SLC) y una porción variable (VpreB) para ser funcional. La Gal-1 se une a la superficie de las células estromales a través de receptores glicosilados. La unión de la porción SLC de la célula Pre-B a la superficie de la célula estromal es intermediada por la presencia de Gal-1 asociada a la membrana de la célula estromal y de la célula Pre-B. Es decir que la Gal-1 secretada por células estromales es capturada por Pre-BCR, por contra receptores cis en la célula B y contrariamente por receptores trans sobre las células estromales. Por lo tanto, la Gal-1 actúa organizando tridimensionalmente ciertos receptores glicídicos de células estromales y del Pre-BCR (Gauthier *et al.*, 2002) (**Fig. 1.6**).

Introducción

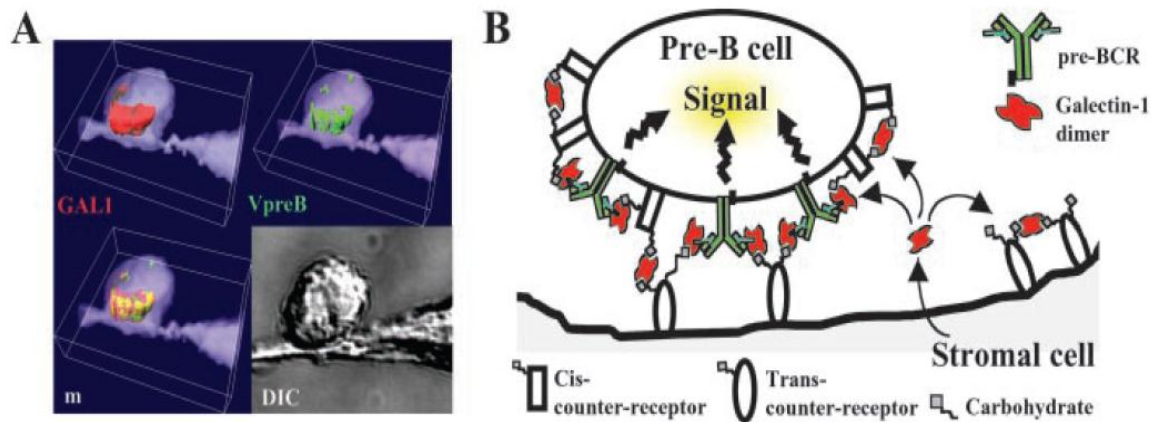


Figura 1.6. Modelo para visualizar la organización molecular de la sinapsis de células estromales y de los pre-B (A) Construcción sobre la superficie 3D de Gal-1 y distribución en la superficie celular de pre-BCR y la formación de sinapsis de células estromales. Las superficies se han reconstruido a partir de los datos experimentales presentados en la Fig. 3D. Esta representación muestra que los pre-BCR están incluidos en la zona de relocalización de Gal-1. (B) La Gal-1 es secretada por las células del estroma y capturada por pre-BCR, así como también por los cis y trans contra-receptores. El modelo propone que la Gal-1 organizaría una *celosía* en 3D que agruparía y uniría los contra-receptores con los pre-BCRs. Los resultados de la formación de sinapsis de células estromales pre-B favorecerían la relocalización y la iniciación de la señalización del pre-BCR. **Tomado de Gauthier *et al.*, 2002.**

La geminina-4 se encuentra en el citoplasma y en el núcleo de las células como un miembro del complejo proteico neuromotor (SMN) y como partículas miRNP, microribonucleoproteínas (RNP) y microARN (MiARN). Se cree que el SMN nuclear está involucrado en los procesos de splicing de pre-ARN. Se sabe que la Gal-1 nuclear interacciona con la Geminina-4 de manera independiente del CDR y coimmunoprecipita con el complejo SMN nuclear, por lo tanto, esto explicaría su participación en la vía de *splicing* (Patterson *et al.*, 2015).

Por otro lado, se sabe que la Gal-1 interacciona de manera lactosa-independiente con trifosfatoguanosina H-Ras (H-Ras-GTP) a través de farnesilcisteína carboximetiléster, reforzando así su asociación a la membrana. Se ha sugerido un mecanismo para los nanoclustering H-Ras que involucra a la Gal-1 con una doble función, como una proteína crucial en el pasaje del complejo y por otro lado como una proteína acompañante o *chaperona* que contribuiría al tráfico de H-Ras facilitando su retorno al complejo de Golgi en su forma depalmitoilada para ser palmitoilada nuevamente. Por lo tanto, la unión de Gal-1 a Ras es una de las más interesantes y potencialmente importantes funciones de Gal-1. (Belanis *et al.*, 2008) (**Fig. 1.7**)

Introducción

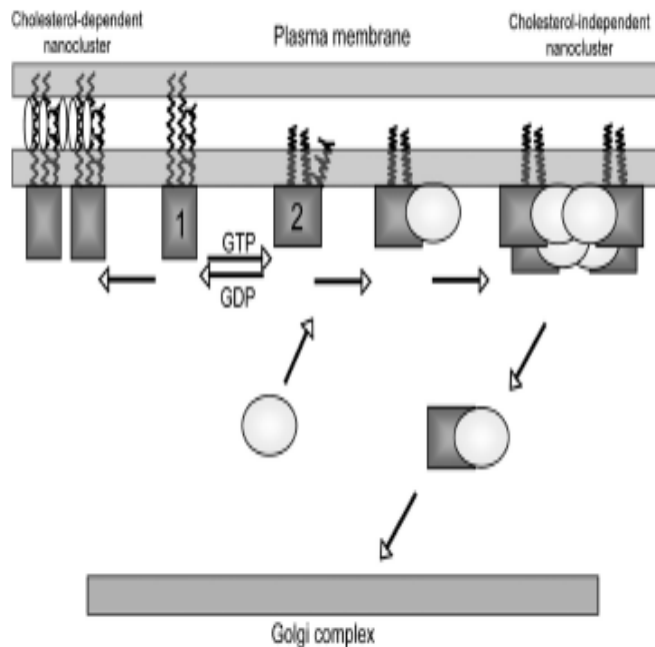


Figura 1.7. Gal-1 en la segregación lateral H-Ras GTP-dependiente, sobre la base de modelos de H-Ras descritos por Gorfe A.A. *et al.* (2007), en una bicapa lipídica (Gorfe *et al.*, 2007). Belanis *et al.* propusieron que el H-Ras (representado como cuadrados) en la membrana plasmática existía en dos estados conformacionales que se caracterizan por diferentes modos de interacción con la membrana. El H-Ras que carga al GDP, preferentemente asume un estado conformacional que es caracterizado por extensas cadenas de acilo, profundamente arraigadas (modelo 1). Esta conformación puede ser estabilizada por la interacción con el colesterol, conduce a la formación de nanoclusters de colesterol dependiente de H-Ras-GDP. El H-Ras que carga el GTP adopta preferentemente un estado conformacional (modelo 2) con una membrana interfacial proteica de área más grande y cadenas acilo más flexibles. En esta conformación del grupo farnesil está también menos profundamente inserto en la bicapa. El factor de activación de crecimiento, H-Ras.GTP asume preferentemente esta conformación permitiendo la interacción del grupo farnesilo con el bolsillo prenil vinculante con Gal-1 (Gal-1 es representado como un círculo). Después de la interacción del grupo farnesilo con el bolsillo de unión de prenil de Gal-1, el grupo de palmitato en C184 es el componente primario de regulación de la segregación lateral de H-Ras en dominios de colesterol-independiente. La interacción con Gal-1 estabiliza la conformación H-Ras.GTP permitiendo a los complejos de H-Ras.GTP-Gal-1 actuar como un edificio de bloques para los nanocluster H-Ras.GTP, que sería la plataforma de señalización para la acción de los efectores. Luego la depalmitolación de H-Ras, Gal-1, mediante el blindaje del grupo farnesil hidrófobo, actuaría como una *chaperona* para promover la libre difusión de H-Ras de la membrana plasmática a través del citosol al complejo de Golgi. Tomado de Belanis *et al.*, 2008.

Por otro lado, se sabe que la proteína oncogénica H-Ras contribuye en varios aspectos al fenotipo tumoral incluyendo la regulación del crecimiento celular, apoptosis, adhesión, migración y metástasis. Las dos vías principales corriente abajo de H-Ras son las vías de señalización de PI3K y RAF-1/MAPK/ERK. La proteína H-Ras asociada a la membrana plasmática recluta a la Gal-1 desde el citosol a la membrana y la Gal-1 dirige la señal hacia RAF-1 a expensas de PI3K. La sobreexpresión de Gal-1 favorece la asociación de H-Ras-GTP a la membrana celular, donde funciona como una plataforma para la señalización a través de RAF-1, desencadenando la activación sostenida de MAPK/ERK. De esta manera, a través de su interacción con H-Ras, Gal-1 contribuye a la transformación maligna. La metástasis tumoral incluye una serie de eventos como adhesión celular, invasión, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. Teniendo en cuenta que el efector y Gal-1

Introducción

podrían formar complejos previamente en el citoplasma a concentraciones altas, la Gal-1 puede dimerizarse y unirse directamente al dominio de unión Raf (RBD) de efectores, tales como Raf de unión Ras. De esta manera, la Gal-1 dimérica podría estabilizar los efectores Raf, que a su vez actúan como el *andamiaje* real del *nanocluster* H-Ras. Los dímeros apilados de H-Ras + efector (Raf) + Gal-1 (caja de la derecha) serían el crecimiento de la nucleación del *nanocluster* H-Ras, un proceso que puede ser desarrollado en la membrana (Blaževič *et al.*, 2016) (**Fig. 1.8**).

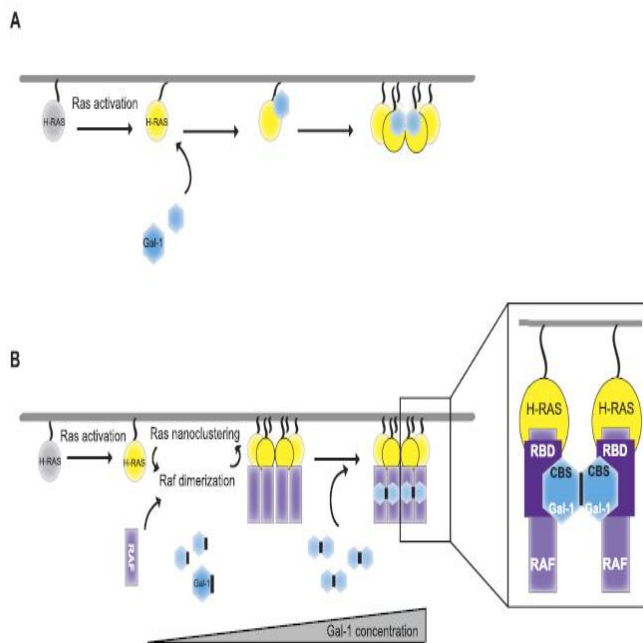


Figura 1.8. Comparación del modelo actual y del nuevo modelo propuesto por Blaževič *O. et al.*, para el mecanismo de acción de Gal-1 como un *soporte-nanocluster*. (A) Modelo actual. La interacción directa de H-ras activo y la Gal-1 estabilizada en el *nanocluster*. La activación de H-ras (representado como óvalo amarillo) supuestamente hace que la cadena C-terminal farnesil de H-ras esté más accesible para el bolsillo de unión de prenil de Gal-1 (representado como un hexágono azul). Este paso mecanicista no ha sido descrito para otras chaperonas acompañantes similares, como GDIs o PDEδ. El estado de desactivación independiente de la disociación de la membrana es la base para la formación de estos complejos por tales chaperonas en el citoplasma (Silvius *et al.*, 2006; Rocks *et al.*, 2006). (B) En el nuevo modelo, los efectores Raf (representado en forma de rectángulos de color violeta) son reclutados para activar H-ras en nanoacumulaciones de la membrana plasmática. Tomado de Blaževič *et al.*, 2016.

Recientemente Posada *et al.* (2017) descubrieron una nueva retroalimentación específica de H-Ras, que conduce a una activación involuntaria inducida por rapalogs (droga sintética análoga a la rapamicina) de tumorigenicidad en células transformadas por Ras. Se encontró que rapalogs específicamente aumentaba la agrupación (*nanoclustering*) de H-Ras oncogénico en la membrana plasmática. Esto producía un aumento en la señalización de H-Ras, promoviendo el crecimiento del tumor *de novo*. Estos resultados han revelado la importancia de Gal-1 en la regulación de la formación de los nanocluster, siendo responsable del aumento inducido por rapamicina en la producción y señalización de H-Ras. De esta manera se dilucidan evidencias de que Gal-1 promueve características de troncalidad (*stemness*) en células tumorigénicas. Por lo tanto, se podría bloquear la inducción de la troncalidad en las células transformadas con H-Ras por inhibidores específicos de Gal-1, que anularían

su efecto sobre los nanoclúster de H-Ras. En un nivel más general, estos hallazgos podrían agregar una importante explicación mecanicista a los efectos fisiológicos pleiotrópicos que se observan con los rapalogos.

1.1.3. Funciones biológicas de las galectinas

Inicialmente se pensó que las galectinas sólo se unían a glicanos endógenos (*proprios*) y mediaban los procesos de desarrollo incluyendo la diferenciación celular y la organización tisular, pero posteriormente se ampliaron sus funciones, demostrándose que interviene en la regulación de la homeostasis inmune. Se sabe que 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* (balsa) de lípidos que se requieren para la transmisión óptima de señales relevantes para la función celular (Vasta, 2009) (**Fig. 1.9**).

El ensamblado de las galectinas mediado por *rafts* de lípidos que modulan el recambio de receptores endocíticos señalizan vías de transducción que conducen a la activación de células T, secreción de citocinas, apoptosis, maduración de células B, activación, tolerancia, activación de neutrófilos que conduce a la fagocitosis, estallido oxidativo, liberación de proteasas y citocinas. Por lo tanto, 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 (Dam *et al.*, 2008).

Introducción

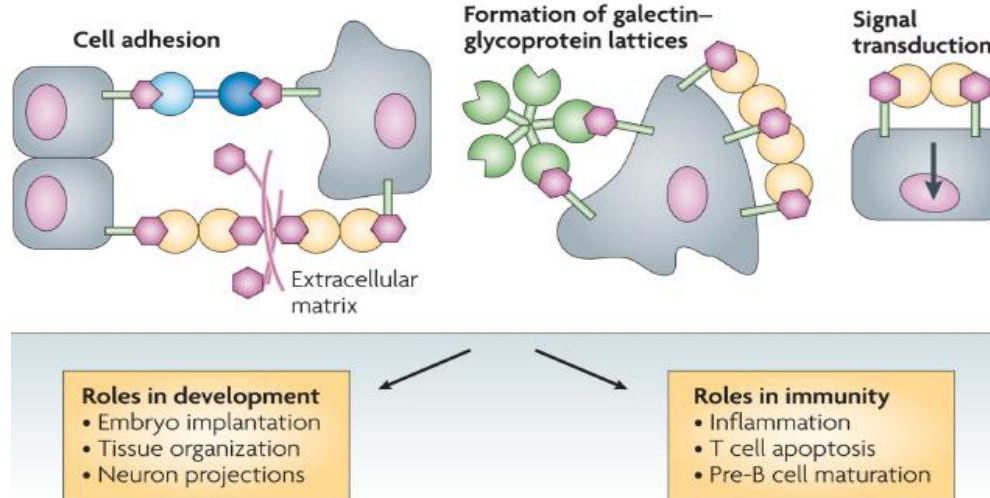


Figura. 1.9. Funciones biológicas de las galectinas. Tomado de Vasta, 2009.

Por otro lado, los complejos lectina-glicano se encargarían también de regular los receptores de la superficie celular y la capacidad de respuesta del receptor a los agonistas, así como también el control de la rotación de receptores (Elola *et al.*, 2015). Además, se han demostrado funciones esenciales para las interacciones Gal-1-glicano en el control inmunológico y vascular (Toscano *et al.* 2007).

Se sabe que la Gal-1 contribuye a la adhesión heterotípica de las células tumorales y de las células endoteliales a la matriz extracelular, etapas críticas durante las primeras fases de la invasión tumoral y metástasis (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

A su vez, como se mencionó previamente, dentro del compartimento intracelular la Gal-1 interactúa con el trifosfato de guanosina oncogénico H-Ras- (H-Ras-GTP) a través de su grupo farnesilo, mejorando la transformación mediada por H-Ras mediante la señalización de ERK1/2 (Belanis *et al.*, 2008).

1.1.3.1. Las galectinas en el sistema inmunológico

Los papeles propuestos para las galectinas, tanto de vertebrados como de invertebrados, en las funciones inmunes se han desarrollado ampliamente por su habilidad en reconocer directamente a los patógenos microbianos, virales, bacterianos y parásitos protozoarios (Dias-Baruffi *et al.*, 2010).

Introducción

Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* han dilucidado las funciones de las galectinas expresadas por las células del sistema inmune y por las células del estroma circundante en el desarrollo y regulación de la homeostasis inmune innata, así como también en las respuestas a los retos infecciosos, alérgicos y cáncer. 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 NK, células T γ/δ y células B-1) y adaptativa (células B y T activadas), entre otras (Stowel *et al.*, 2008).

A su vez, se sabe que la Gal-1 se expresa en el timo, en los nódulos linfáticos, en el bazo, en la MO y en los sitios inmunoprivilegiados, siendo capaz de modular la respuesta inmune innata y adaptativa. Por ende, las galectinas liberadas por las células del estroma en compartimentos centrales contribuyen a la diferenciación de los precursores de las células inmunes. Por lo tanto, la respuesta inmune y las diferentes condiciones patológicas pueden conducir a una posterior activación y diferenciación de las células inmunes, modulando la expresión y liberación de las galectinas al espacio extracelular donde pueden tener efectos autócrinos o parácrinos 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 *et al.*, 2007a).

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 Gal-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 *et al.*, 2007b).

Se sabe que 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 desgranulación y liberación de factores (histamina, por ejemplo) que conducen a la activación de los mecanismos inmunes en la ausencia del antígeno. Respecto a las respuestas inmunes de adaptación, se ha propuesto que las galectinas son reguladores de la homeostasis de las células

Introducción

inmunes. Las interacciones entre las células del estroma de la MO, 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 *et al.*, 2006).

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 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 Gal-1 desvía el equilibrio de una respuesta TH1 polarizada hacia una respuesta TH2, mientras que al reducir los niveles de IL-5, la Gal-3 tiene el efecto opuesto (Yakushina *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que los linfocitos Treg humanos sobreexpresan la Gal-1 y dicha expresión se incrementa en linfocitos Treg activados con anticuerpos anti-TCR. El bloqueo de la Gal-1 con anticuerpos monoclonales inhibe la actividad supresora de dichos linfocitos Treg, sugiriendo que Gal-1 es un regulador de la función de linfocitos Treg. Se sabe que 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. Por lo tanto, la carencia de la actividad de linfocitos Treg conduce a condiciones patológicas caracterizadas por una exacerbada respuesta inmunológica. (Büchel *et al.*, 2016).

Por otro lado, pacientes con enfermedad de Chagas aguda y crónica infectados por el *Trypanosoma cruzi* humano desarrollan anticuerpos anti-Gal-1 y la inmunorreactividad se correlaciona con la gravedad del daño cardíaco (Benatar *et al.*, 2015). Se ha dilucidado actualmente que la infección por *T. cruzi* genera un programa regulatorio en células dendríticas y células T mediante mecanismos dependientes de la Gal-1 (Poncini *et al.*, 2015).

Se sabe que la enfermedad crónica aumenta la expresión de la Gal-1, por lo tanto, la sobreexpresión Gal-1 en el corazón, como parte de la respuesta inflamatoria a las enfermedades y lesiones de dicho órgano, pueden causar la emisión de Gal-1 y la inducción de autoanticuerpos. En el

Introducción

trabajo de Benatar *et al.* (2015) se demuestra que: a) Gal-1 inhibe la infección por *T. cruzi* de células cardíacas y b) la infección del parásito altera el glicofenotipo de la superficie de las células cardíacas, produciendo la restricción de Gal-1 y, posiblemente, limitando su actividad inhibidora. Es importante mencionar que estos efectos eran dependientes de varios parámetros entre los cuales podemos destacar: el inóculo, la vía de entrada del parásito y el sexo del huésped. Por lo tanto, se puede concluir que la modulación de las interacciones Gal-1-glicano en las células cardíacas puede influenciar la lesión cardíaca inducida por el parásito, conclusión coincidente con los trabajos previos.

La amplia expresión y localización citosólica de Gal-1 parece ser uno de los factores que regulan el volumen de turnover de leucocitos y puede reflejar un mecanismo por el cual los leucocitos están involucrados en la inmunidad innata, tales como neutrófilos. Consistente con esto, Gal-1 inhibe la quimiotaxis e induce el turnover de los neutrófilos. Los neutrófilos a menudo dañan el tejido viable durante los episodios de inflamación aguda, resultando en la pérdida de contenido intracelular. Pero a pesar de esto, los neutrófilos han despertado el interés de los inmunólogos, debido a que son verdaderos tomadores de decisiones que salvan vidas, entrenando a las DC, a los monocitos y a los linfocitos, a su vez, que ayudan al organismo a decidir cuándo iniciar o mantener una respuesta inmune. Por lo tanto, son únicos en su capacidad para destruir y ayudar a curar cualquier tejido del cuerpo, por lo que lograr comprender los circuitos que confieren y controlan tal comportamiento es un desafío interesante. Se ha corroborado que la liberación de Gal-1 durante la lesión mediada por leucocitos puede activarlos y por lo tanto inhibir su quimiotaxis e inducir su turnover (Dias-Baruffi *et al.* 2010).

Se piensa entonces que debe existir un equilibrio entre la inflamación y la antiinflamación. En casi todos los casos, la causa fundamental del daño tisular se debe a la acumulación de leucocitos. Se han realizado diferentes tipos de estudios para dilucidar este aspecto, que incluyen inhibición de anticuerpos, ensayos de adhesión, modelos de cámara de flujo de placas paralelas y microscopía intravital en animales pequeños para visualizar *in vivo* interacciones de leucocitos con la pared del vaso. Dichos estudios han ayudado a establecer que i) las interacciones iniciales entre leucocito-endotelio (captura y rodadura) son impulsadas principalmente por la familia de moléculas llamadas selectinas junto con sus ligandos oligosacáridos y ii) la adherencia firme y transmigración son mediadas por integrinas de leucocitos que interactúan con la superfamilia de moléculas de inmunoglobulinas de adhesión endotelial. Por lo tanto, la fase reparadora y de resolución de la

1.1.3.2. Gal-1 y el desarrollo celular

La Gal-1 está involucrada en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento de células madre neurales, la diferenciación de células del linaje hematopoyético y del músculo esquelético (Camby *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008) y en la regeneración axonal (Quinta *et al.*, 2014).

Se sabe que la Gal-1 se expresa durante el ciclo menstrual femenino. Los cambios cíclicos en la preparación del endometrio para la implantación son regulados por las hormonas esteroideas estrógeno y progesterona, que median su función a través de sus receptores nucleares. El aumento de los niveles de estrógeno durante la primera mitad del ciclo dirige la proliferación de células endometriales epiteliales y estromales, mientras que la progesterona promueve la diferenciación del estroma, desempeñando un papel clave en la definición de la ventana de la receptividad uterina durante la fase secretora (**Fig. 1.11**) (Barrientos *et al.*, 2014).

La expresión de Gal-1 endometrial fluctúa durante el ciclo femenino y gestación concomitante regulada por hormonas esteroides. Se ha descubierto que el promotor LGALS1 es sensible a la mitad de los estrógenos, junto a otros elementos que son inducidos por estrógeno, por ejemplo, el factor de transcripción nuclear (NF) y el activador de la proteína 2. Se sabe que el gen LGALS1 ha evolucionado en los mamíferos placentarios, indicando que estos cambios funcionales pueden haber sido importantes en la emergente tolerancia inmune materno-fetal. Coincidentemente con esto, la progesterona y el estrógeno demostraron aumentar los niveles de Gal-1, mientras que el bloqueo de sus receptores nucleares con inhibidores específicos anuló este efecto. Adicionalmente, se encontró una relación funcional importante entre la Gal-1 y la progesterona para el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmune durante el embarazo. Experimentos *in vivo* demostraron que Gal-1 aumenta los niveles circulantes de progesterona y el factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) y, recíprocamente, la expresión de Gal-1 en las células deciduales y estromales está *up*-regulado después de administrar suplementos de dihidroprogesterona, un derivado de progesterona, en un modelo de ratones que producían abortos espontáneos. A su vez, sorprendentemente, en estudios *in vitro* se demostró un efecto inhibitorio de Gal-1 sobre la secreción de progesterona por las células granulosas ováricas como resultado de la interferencia con la interacción del receptor de FSH. Por otro lado, se detectó un fuerte aumento en la expresión de Gal-1 en los cuerpos lúteos regresivos de ratones, seguido por los niveles *up*-regulados de la progesterona degradada por la enzima 20a-hidroxiesteroide

Introducción

deshidrogenasa (20a-HSD). Estos hallazgos, junto con la ausencia de la expresión de Gal-1 en los cuerpos lúteos de embarazadas sugieren que esta lectina es un modulador negativo de la producción de progesterona y una señal de la luteólisis funcional (Barrientos *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la estimulación con Gal-1 recombinante (rGal-1) inhibe la secreción de progesterona por células BeWo, una línea celular de coriocarcinoma ampliamente utilizada como un modelo *in vitro*, imitando la transformación de citotroblastos vellosos (CTB) en sincitio. La reducción de la progesterona por Gal-1 fue dependiente de la dosis y parecía requerir la unión funcional al antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF, Galbeta1-4GlcNAc y Galbeta1-3GalNAc). Estos resultados serían consistentes con la expresión diferencial de Gal-1 en las líneas CTB y EVT y argumentan un papel de esta lectina como un señalizador paracrino que modula la función placentaria. Sin embargo, no se ha determinado todavía de qué forma la progesterona influye en la regulación placentaria por secreción/expresión de la Gal-1 en los diferentes subconjuntos de trofoblasto en la placenta de ratón y humana. Sería interesante comprender, en un futuro, la manera en que la principal hormona del embarazo dirige la diferenciación placentaria mediante la regulación de la Gal-1 localmente (Barrientos *et al.*, 2014).

Introducción

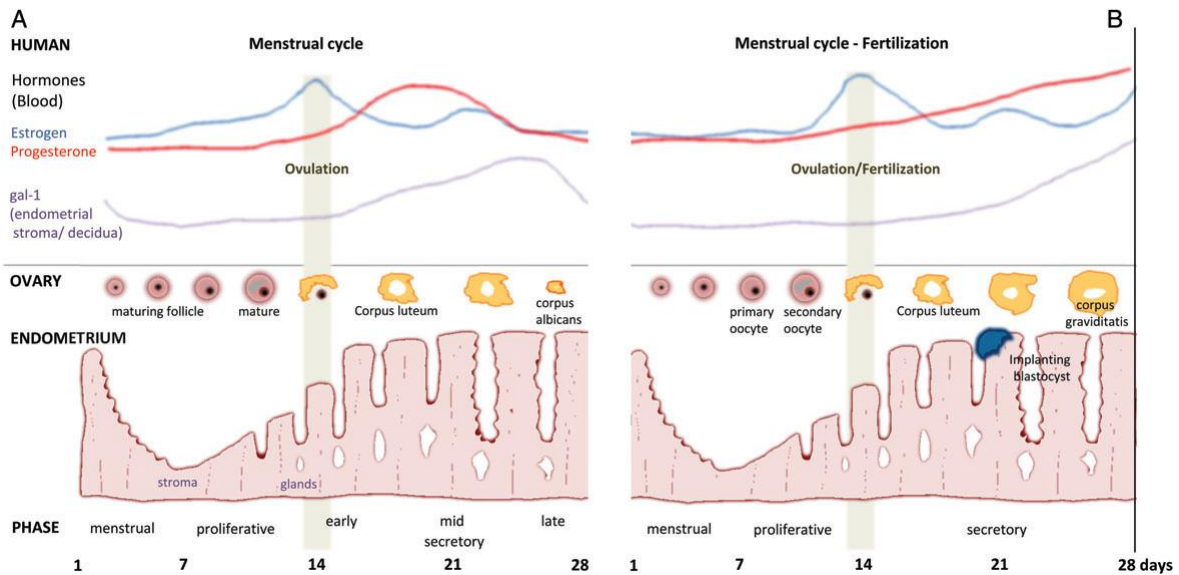


Figura 1.11. Los cambios dinámicos en la expresión de Gal-1 endometrial caracterizan el ciclo menstrual y el embarazo. En los seres humanos, la expresión de Gal-1 está *up*-regulada durante la fase secretora del ciclo menstrual, concomitante con la regulación por el aumento de los niveles de progesterona (A). La expresión de Gal-1 en este periodo parece ser importante para la transformación de células endometriales estromales (decidualización) y el establecimiento de la ventana de la receptividad uterina. Si la implantación se produce (B), los niveles de Gal-1 deciduales siguen siendo altos y serán importantes en la mediación de las adaptaciones maternas al embarazo como inmunomodulación y remodelación vascular. **Tomado de Barrientos *et al.*, 2014.**

La expresión de Gal-1 se ha detectado en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario.

Se sabe que los embriones humanos de 3 y 5 días expresan Gal-1 en el trofotodermo que posteriormente dará lugar a los trofoblastos diferenciados de la placenta y a la masa celular interna (MCI) que eventualmente forma las estructuras definitivas del feto. Además, se ha demostrado que los embriones humanos secretan Gal-1 en el medio en el que se cultivan, lo que sugiere que las funciones extracelulares de esta lectina podrían ser importantes para el blastocisto durante la ventana de implantación uterina. Apoyando esta teoría, Jeschke *et al.* (2009) demostraron que Gal-1 se une a mucina-1 (MUC1) a través del epítopo TF sobre células epiteliales glandulares y tejido superficial apical epitelial endometrial. Curiosamente, la expresión de MUC1 y TF son regulados positivamente desde la fase proliferativa hasta la fase de secreción tardía del ciclo menstrual, lo que sugiere que la Gal-1 derivada de embriones puede unirse a MUC1 endometrial a través del epítopo TF durante la implantación. Es importante destacar que los seres humanos parecen ser una excepción en términos de la expresión de MUC1 durante la ventana de la receptividad uterina, con respecto a la mayoría de las

Introducción

especies (incluyendo ratones), debido a que en ellas este proteoglicano es antiadhesivo y es por lo tanto *down*-regulado en el epitelio luminal uterino concomitante con la implantación (Jeschke *et al.*, 2009).

La fusión sincitial es un proceso esencial para el mantenimiento del sincitio trofoblasto (CTB), una capa de trofoblasto terminalmente diferenciada, responsable para la mayoría de las funciones biológicas asignadas a la placenta. Este proceso celular depende de una serie precisa de eventos mediados por la membrana y está regulado por múltiples factores, incluyendo citoquinas, proteínas de fusión, proteasas y proteínas citoesqueléticas. La capacidad de las cadherinas para mediar las interacciones célula-célula son dependientes de las interacciones de al menos tres proteínas asociadas al citoesqueleto conocidas como cadherinas a, b y g. Durante la agregación, diferenciación y fusión de células CTB humanas, existe una importante *down*-regulación de la expresión de E-cadherina y de b-catenina. Se sabe que la Gal-1 es capaz de mejorar la fusión de BeWo, células usadas para imitar la formación del sincitio *in vitro* mediante la regulación negativa de la expresión de la b-catenina y E-cadherina (**Fig. 1.12**) (Barrientos *et al.*, 2014).

Dicho hallazgo estaría de acuerdo con la función de Gal-1 en el inicio de la fusión de mioblastos y la reducción de la formación de la miofibra observada en ratones Gal-1-*null*. El efecto extracelular de Gal-1 sobre la formación de sincitio en la línea celular BeWo está acompañada por la inhibición de la proliferación evidenciada por la expresión disminuida de Ki67 (marcador de proliferación celular) y la incorporación de BrdU. El efecto antiproliferativo de Gal-1 resulta de la inhibición de la vía Ras-MEK-ERK (Fischer *et al.*, 2005) y la diferenciación de CTB en sincitio trofoblasto se caracteriza por una reducción de las actividades de ERK1/2 y p38 MAPK. Se ha demostrado que la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)/ERK2 se reduce con el tratamiento con Gal-1 en células BeWo. Además, las señales *up-stream* de ERK1/2 y p38 MAPK, tales como RE durante la transfección (RET) y Janus Kinase (JAK)2, fueron reguladas hacia abajo por el tratamiento con Gal-1 (Fischer *et al.*, 2009), lo que sugiere que esta lectina se une a RET a través de proteínas de superficie celular unidas a glicosilfosfatidilinositol vía el epitope de TF que finalmente resulta en la inhibición del crecimiento (**Fig. 1.12**) (Barrientos *et al.*, 2014).

Sin embargo, los tratamientos con Gal-1 inducen la fosforilación del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR3), que ha sido implicada en la supervivencia celular bajo condiciones de stress. Por lo tanto, la Gal-1 extracelular puede influir en la supervivencia celular a través de la vía

Introducción

VEGFR3 y regular el crecimiento celular a través de la vía Ras-MEK-ERK (**Fig.1.12**), contribuyendo a la formación de sincitio anclado sobre las vellosidades. En contraste, la Gal-1 intracelular no parece estar implicada en la regulación del crecimiento celular, ya que hemos demostrado que la administración de un oligodesoxinucleótido contra Gal-1 no alteró el crecimiento de la línea celular extravellosa invasiva proliferante CTB (HIPEC). Dicha evidencia ha permitido especular que tanto la Gal-1 intracelular como la extracelular tienen actividades diferentes sobre las células trofoblásticas, no implicando ambas la promoción del crecimiento celular. Por el contrario, esta lectina parece regular altamente la transformación celular y la diferenciación durante el proceso de formación de la placenta (Barrientos *et al.*, 2014).

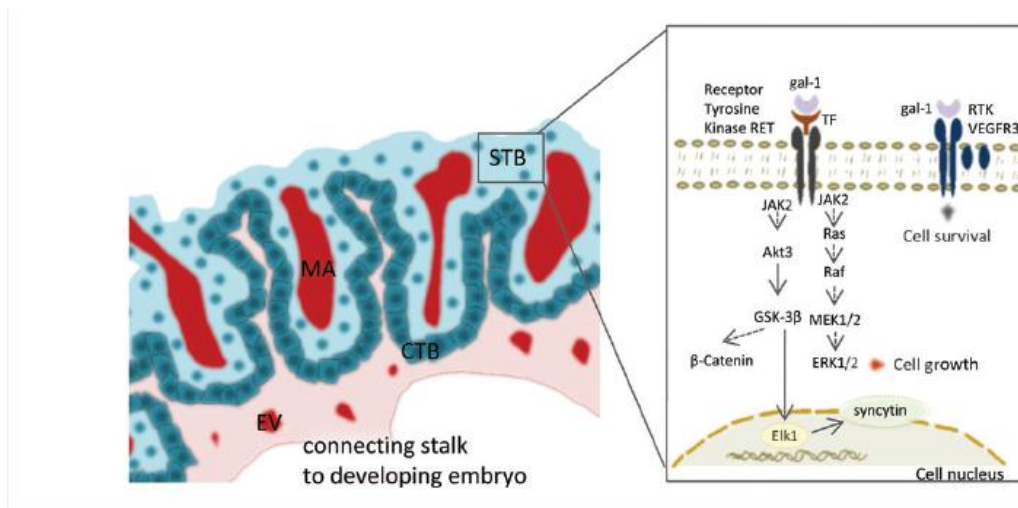


Figura 1.12. Vías de señalización activadas por Gal-1 en el crecimiento de las células trofoblásticas y la formación de sincitios. Gal-1 se une al epítopo TF en células vellosas CTB que conduce a una disminución significativa de la expresión de E-cadherina y β -catenina e inducción de características al sincitio de fusión sincicial. Esto se acompaña de una disminución de la proliferación debido a los efectos inhibitorios de la lectina en la vía Ras-MEK-ERK y las señales corriente arriba emitidas por JAK2 y RET. Sin embargo, la regulación del crecimiento es el resultado del balance entre estas vías y mediados por la unión de Gal-1 al VEGFR3, que ha sido implicado en la promoción de la supervivencia celular bajo condiciones de estrés. CTB, citotrofoblastos; STB, sincitiotrofoblasto; MA, arteriola materna; EV, vasos embrionarios; RTK, receptor de la tirosina quinasa. **Tomado de Barrientos *et al.*, 2014.**

Se sabe que el principal inhibidor de la regeneración axonal es la semaforina 3A (Sema3A), una proteína soluble miembro de la superfamilia de las semaforinas. Durante el desarrollo del sistema nervioso, esta proteína direcciona el crecimiento axonal a través de su unión al complejo receptor neuronal: neuropilina-1 (NRP-1)/plexina A4 (PlexinA4), produciendo un efecto inhibitorio para el crecimiento axonal al desencadenar señales que actúan directamente sobre la dinámica de los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Una vez establecida la correcta formación de los

Introducción

circuitos axonales, la expresión de Sema3A disminuye hasta niveles indetectables en la médula espinal adulta sana. Al producirse una lesión traumática de la médula espinal (LTME), la concomitante ruptura de las meninges permite la migración de los fibroblastos meningeales, los cuales además de expresar y secretar la Sema3A, ingresan al sitio de lesión conformando la cicatriz glial. Asimismo, tanto los tractos axonales descendentes axotomizados como las neuronas en el sitio de lesión aumentan la expresión del complejo receptor NRP-1/PlexinA4 aumentando la avidéz por Sema3A y produciendo el colapso del cono de crecimiento axonal. Por lo tanto, la interrupción de la señalización mediada por Sema3A constituye un potencial blanco terapéutico. Se sabe que la Gal-1 existe en un equilibrio monómero-dímero dependiente de su concentración (Rabinovich *et al.*, 1012).

Se sabe que a nivel del sistema nervioso central (SNC), Gal-1 participa en la proliferación de progenitores neurales en el cerebro adulto, en la regulación de la neurogénesis y en forma indirecta en la regeneración neuronal. Además, se demostró que la Gal-1 previene la neurodegeneración por inactivación de la microglía tipo-1 (M1) en un modelo de neuroinflamación autoinmune. Por otro lado, en modelos no neuronales se observó que Gal-1 interacciona con NRP-1 modulando la migración de células endoteliales. Recientemente, el grupo de Quinta *et al.* (2014), trabajó con Gal-1 recombinante administrada *in situ* al momento de una LTME en concentraciones que desplazaban el equilibrio hacia la forma dimérica, tratando de evitar la unión de Sema3A al complejo receptor NRP-1/PlexinA4, por unión directa de dicho complejo a Gal-1 a través de una interacción proteína-glicano, evitando así la inhibición de la regeneración axonal. Estos resultados fueron los primeros indicios que indicaron que Gal-1 endógena estaría desplazada hacia la conformación monomérica, ya que sólo a altas concentraciones de la proteína exógena (equilibrio desplazado hacia la forma dimérica) se consiguió una recuperación motora coordinada. Pudieron concluir, entonces, que la adición exógena de D-Gal-1 produjo una disminución significativa en la respuesta inflamatoria y que además la Gal-1 endógena tuvo una acción protectora.

En la Fig. **1.13** está representado esquemáticamente el modelo del mecanismo propuesto para la regeneración axonal por Gal-1. De este modo se demostró que Gal-1 en la forma monomérica podría producir regeneración axonal, pero no puede producir recuperación de la actividad locomotora, debido a que carece de la propiedad de unirse a los glicanos específicos del complejo receptor neuronal. Por lo tanto, si bien esta forma de Gal-1 puede inactivar la microglía protegiendo a las neuronas corriente

Introducción

arriba y abajo del sitio de lesión, este efecto es insuficiente para recuperar las funciones motoras (Quinta *et al.*, 2014).

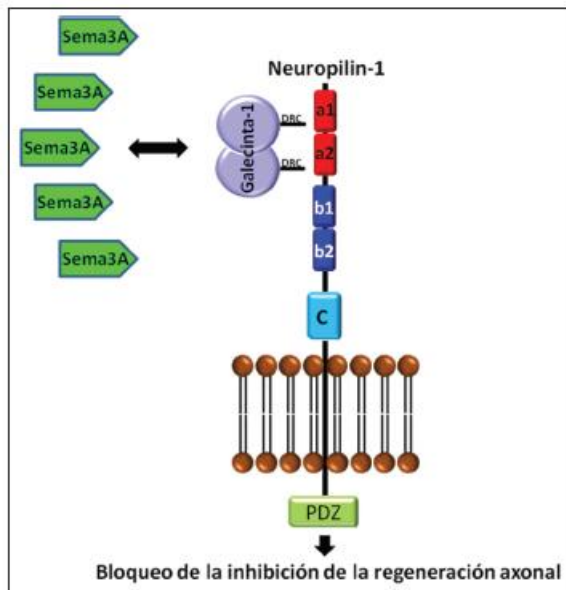


Figura1.13. Representación esquemática del modelo mecánico propuesto de regeneración axonal por Gal-1.

La NRP-1 es una proteína que tiene un dominio N-terminal extracelular de 835 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 44 aminoácidos. La región extracelular está dividida en 3 dominios formados por a1/a2, b1/b2 y C. La porción citoplasmática tiene un dominio PDZ el cual corresponde a la región de NRP-1 que tiene la propiedad de interactuar con proteínas citoplasmáticas. Por lo tanto, el esquema muestra el bloqueo de la interacción entre Sema3A y el complejo receptor neuronal NRP-1 debido al tratamiento con D-Gal-1 desviada hacia la forma dimérica de la molécula, la cual a través de su dominio de reconocimiento a carbohidratos se une a NRP-1. Tomado de Quinta *et al.*, 2014.

1.1.3.3. Interacción de las galectinas con las plaquetas humanas

1.1.3.3.1. Interacciones galectina-plaqueta, potenciales reguladores de la inflamación, aterosclerosis y procesos metastásicos

Las plaquetas activadas expresan en la superficie celular P-selectina, la cual interacciona con el ligando de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), su contra-receptor en los leucocitos, para formar agregados de plaquetas-leucocitos. Por lo tanto, la activación de plaquetas inducida por la Gal-1 en presencia de leucocitos polimorfonucleares resulta en una formación significativa de agregados celulares. A su vez, la interacción de plaquetas con los leucocitos promueve la activación de ambos tipos de células, una condición crucial para desencadenar la inflamación, remodelación vascular y trombosis. Los agregados de plaquetas-leucocitos representan un vínculo establecido entre la inflamación y la trombosis en síndromes agudos incluyendo enfermedades coronarias y trastornos relacionados (Totani & Evangelista, 2010).

Introducción

La expresión de P-selectina sobre la superficie de las plaquetas, la formación de los agregados plaqueta-leucocitarios y la activación leucocitaria son relevantes eventos en la trombosis venosa profunda (TVP). Dado que las galectinas promueven todas estas respuestas al vincularlas con las plaquetas, podría representar un mecanismo involucrado en la TVP. Mientras la Gal-8 se ha relacionado con procesos proinflamatorios, tanto las actividades proinflamatorias como las antiinflamatorias han sido atribuido a la Gal-1. A pesar de que se sabe que los efectos antiinflamatorios se producen a bajas concentraciones de Gal-1, mientras que los efectos proinflamatorios prevalecen en altas concentraciones, esto aún queda por dilucidarse. Pero, el hecho de que Gal-1 promueva la activación plaquetaria apoya la idea de que, en determinadas circunstancias podría actuar como factor proinflamatorio. A su vez, la interacción de P-selectina con PSGL-1 induce la regulación positiva del factor tisular en la membrana leucocitaria y la producción de micropartículas procoagulantes (MP) (Yang *et al.*, 2008).

La activación de las plaquetas por Gal-1 induce además la expresión de fosfatidilserina en MPs, proporcionando así una superficie catalítica para varios complejos enzimáticos del sistema de coagulación. Estos datos indican que de manera directa o a través de la activación de leucocitos, las interacciones plaqueta-galectina pueden contribuir a activar la cascada de coagulación contribuyendo a un estado protrombótico. Por otro lado, de forma similar a la P-selectina, el vWF se almacena en gránulos α plaquetarios y en cuerpos de de Weibel-Palade de células endoteliales, de los cuales se libera durante las lesiones o inflamación. El vWF es una glicoproteína multimérica de gran tamaño que permite la interacción entre el subendotelio y la plaqueta y, por tanto, es importante para la adhesión plaquetaria y la formación de trombos; el vWF es un biomarcador para la disfunción endotelial y el riesgo cardiovascular y tanto en la inflamación crónica como en la aguda se encuentran altos niveles de vWF (Pacienza *et al.*, 2008).

La liberación de vWF almacenado en gránulos α ocurre después de la activación de las plaquetas por Gal-1 o -8. Por lo tanto, la expresión de la P-selectina y la liberación del vWF mediada por las galectinas podría desempeñar un papel importante en la patogénesis de la formación de trombos y la modulación de las respuestas inflamatorias. La aterosclerosis es un trastorno inflamatorio y la interacción entre las células endoteliales activadas y las plaquetas tiene un papel importante en la iniciación y progresión de la placa de ateroma. Recientemente se ha observado que las plaquetas se

Introducción

adhieren a las células endoteliales tratadas con Gal-8, lo que sugiere que dicha lectina podría desencadenar un estado de activación en el endotelio en un contexto inflamatorio (Cattaneo *et al.*, 2014).

A su vez, se encontró que Gal-8 induce una plétora de las moléculas proinflamatorias en el endotelio que podría no sólo desencadenar la adhesión / activación plaquetaria local sino también alimenta una anomalía patológica dada, tal como la aterosclerosis. Aunque la expresión de Gal-8 en lesiones ateroscleróticas humanas todavía no ha sido explorada, varios grupos demostraron que las galectinas, incluyendo Gal-1, participa en la iniciación, progresión y rotura de la placa de ateroma. Las Gal-1, -3 y -8 no sólo se expresan por los diferentes componentes celulares de las lesiones de ateroma, sino también promueven la proliferación de células del músculo liso y de los macrófagos en células espumosas a través de la absorción de lipoproteínas o productos finales de glicación avanzada (AGE) (Papaspyridonos *et al.*, 2006).

La expresión de galectinas en el interior de la placa de ateroma no sólo puede representar amplificadores fuertes de la activación plaquetaria sino también pueden ser componentes clave del núcleo trombogénico expuesto después de la rotura de la placa, desencadenante de la formación de trombos agudos y causal de la angina de pecho, el infarto de miocardio, el ataque isquémico transitorio y el stroke. La evidencia de la función de las galectinas en la aterosclerosis también ha surgido de los estudios de asociación del genoma de pacientes con infarto de miocardio en poblaciones asiáticas, aunque estos hallazgos no se han reproducido hasta la fecha en poblaciones con otras ascendencias (Kimura *et al.*, 2007).

Se sabe que el agotamiento o inactivación funcional de las plaquetas a través de manipulaciones genéticas y farmacológicas reduce la progresión tumoral y la metástasis. Las plaquetas pueden influir en el potencial metastásico de las células tumorales por varios mecanismos: (I) a través de la liberación de una variedad de mediadores inflamatorios que pueden influir en el crecimiento tumoral y la formación de estroma; (II) mediante la expresión de P-selectina, las plaquetas pueden contribuir a la adhesión estable al endotelio y/o trans migración de células tumorales fuera de la vasculatura; (III) a través de la formación de agregados heterotípicos entre mucinas en el cáncer circulante y la P-selectina en plaquetas activadas que pueden proteger a las células del tumor contra el ataque inmune. La formación de agregados de células mixtas entre las células tumorales que expresan altos niveles de

galectinas y las plaquetas, que también podrían representar un mecanismo molecular de interacción entre P-selectina y la mucina, contribuirían a la progresión tumoral y metástasis. Curiosamente, y en contraste con las interacciones mucina-P-selectina, la interacción de las células tumorales con plaquetas vía galectinas no requeriría la presencia de plaquetas activadas (Etulain & Schattner, 2014).

1.1.3.3.2. Control de la angiogénesis por las galectinas involucradas en la liberación de los factores proangiogénicos derivados de plaquetas

Actualmente las plaquetas están siendo reconocidas como factores importantes en cada paso de la formación de los vasos, ya que constituyen una importante matriz de factores de crecimiento, quimiocinas, citoquinas, proteasas y moléculas de adhesión celular (Patzelt & Langer, 2012).

Las sustancias pro-angiogénicas contenidas en las plaquetas incluyen el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epitelial y el factor derivado de células estromales-1 α . Además, las moléculas antiangiogénicas son secretadas por las plaquetas e incluyen trombospondina 1 (TSP-1), endostatina, factor plaquetario 4 (FP-4), angiostatina, inhibidor tisular de las metaloproteinasas-1 y -4 e inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1). Se ha demostrado que los factores angiogénicos se encuentran en poblaciones morfológicamente distintas de gránulos α , en megacariocitos y plaquetas y pueden ser diferencialmente liberados, basado en el compromiso selectivo de los receptores plaquetarios, proporcionando un mecanismo por el cual las plaquetas pueden modular localmente y secuencialmente la angiogénesis. Aunque las plaquetas contienen moléculas pro y antiangiogénicas, existe un consenso general de que las plaquetas promueven la angiogénesis mediante la estimulación de la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células endoteliales y reclutamiento de células progenitoras a sitios de lesión vascular. La amplificación de la angiogénesis por las plaquetas juega un papel positivo y beneficioso en varios procesos, como en la activación plaquetaria por galectinas, embarazo y la curación de tejidos, donde es requerido el desarrollo de nuevos vasos. Sin embargo, en las condiciones clínicas asociadas con la angiogénesis anormal o excesiva incluyendo cáncer, aterosclerosis y artritis, las plaquetas pueden contribuir a la progresión perjudicial de estas enfermedades. Diferentes miembros de la familia de galectinas pueden selectivamente regular la liberación de moléculas angiogénicas por las plaquetas. A su vez, las tres galectinas tienen la capacidad

Introducción

de activar la liberación de VEGF, pero sólo Gal-8 puede ser capaz de inducir la secreción de endostatina; dicho hallazgo estaría de acuerdo con el nuevo paradigma de la secreción de gránulos plaquetarios, que apunta a la liberación diferencial de VEGF o endostatina, no siendo solo producida por los clásicos agonistas plaquetarios, sino también por la activación plaquetaria producida por las galectinas. A pesar de la secreción de VEGF o de endostatina, la activación plaquetaria generada por la estimulación de cada galectina estimula respuestas angiogénicas *in vitro*, incluyendo la proliferación de células endoteliales y tubulogénesis. La actividad de las plaquetas angiogénicas es independiente del VEGF y está asociada claramente a la acción concertada de otras moléculas pro-angiogénicas liberadas por cada galectina (Etulain *et al.*, 2013).

En función de lo expuesto, los estudios se han centrado en este nuevo desafío, la secreción de pro y antiangiogénicos activados por moléculas agonistas, tales como Tr, ADP o TXA2 (Battinelli *et al.*, 2011).

A su vez, se ha demostrado que la liberación diferencial de VEGF o endostatina no se limita sólo a los agonistas plaquetarios clásicos, sino que también puede ser inducida por los activadores plaquetarios no canónicos, tales como las galectinas. Aunque la estructura y la dinámica de un gránulo de secreción es aún objeto de debate, diferentes hipótesis parecen converger en que las vías de señalización selectiva podrían estar involucradas en la regulación del contenido y exocitosis del gránulo. Las diferencias en la liberación de moléculas pro- y anti-angiogénicas inducidas por galectinas no se asociaron con diferencias en la cinética de secreción debido a divergencias estructurales, sino más bien a las distintas vías de señalización desencadenadas por cada galectina. Ello debido a que mientras la Gal-1 activa PKC y ERK para inducir la liberación de VEGF, la Gal-3 activa una vía dependiente de PKC para estimular la misma respuesta biológica. Por otro lado, la liberación de VEGF por Gal-8 requiere no sólo la activación de la COX-1, sino también la activación de la PKC, p38 (p38MAP, subfamilia de proteína quinasa activada por mitógeno que regula diferentes procesos celulares) y las quinasas Src (familia Src de proteínas no receptores con actividad tirosina cinasa) (Song *et al.*, 2015).

Por otro lado, las plaquetas activadas provenientes de medios condicionados por cada galectina produjeron proliferación celular endotelial y formación de tubos capilares, dos eventos celulares ligados a la angiogénesis. Estos datos indican que, independientemente del efecto diferencial de Gal-1, -3 o -8 sobre la secreción de factores angiogénicos, las galectinas inducen la secreción plaquetaria

Introducción

promoviendo el fenotipo angiogénico. En contraste con la función tradicional de VEGF en la angiogénesis mediada por plaquetas, se encontró que la supresión de la señalización de VEGF utilizando anticuerpos anti-VEGFR2 o anti-VEGF-A no alteraron considerablemente la respuesta celular endotelial, lo que sugiere que este factor podría ser prescindible para la actividad angiogénica de las plaquetas cuando se activan en respuesta a la estimulación por galectina. También se encontró que el bloqueo de EGF, el mayor factor angiogénico liberado de las plaquetas luego de la estimulación con galectinas, inhibía parcialmente la angiogénesis. Además, se observó un grado similar de inhibición cuando se inhibió la actividad de VEGF-A y EGF. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad angiogénica mediada por las plaquetas sería un proceso complejo que parece ser debido a la actividad combinada de varias moléculas relacionadas con la angiogénesis, liberadas por las plaquetas estimuladas con galectinas. En este sentido, se ha demostrado también que la angiogénesis inducida por las plaquetas activadas por Tr, también implicarían la actividad de varios moduladores angiogénicos, pero no de VEGF (Etulain & Schattner, 2014; Etulain *et al.*, 2014).

Estos datos hacen evidente que la secreción de moléculas angiogénicas derivadas de plaquetas constituye un mecanismo alternativo por el cual las galectinas promueven las respuestas angiogénicas y su bloqueo puede conducir al desarrollo de estrategias para las enfermedades relacionadas con la angiogénesis. La Gal-1 es el mayor regulador de respuestas inmunes que implican trastornos de células T, inflamación, alergias e interacciones huésped-patógeno; participa en la metástasis tumoral y la inmunorregulación, así como también en las patologías neurodegenerativas. En consecuencia se han estudiado ampliamente las funciones de Gal-1 y -3 en la progresión y proliferación tumoral, angiogénesis, resistencia a las drogas y enmascaramiento contra el reconocimiento del sistema inmune (Camby *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2015).

Por otra parte, Gal-3 está implicada en las complicaciones metabólicas de la diabetes; su expresión también acompaña los procesos relacionados a la enfermedad cardíaca y al accidente cerebrovascular, fibrosis y la reparación de los tejidos. A su vez, Gal-9 participa en la regulación del nivel de glucosa en sangre y en trastornos metabólicos relacionados como la diabetes, la Gal-7 humana está involucrada en el metabolismo de queratocitos y formación de epitelios relacionados, desarrollo y regeneración a nivel de la córnea y epidermis; también contribuye a la regulación de la apoptosis. Por lo tanto, se puede concluir que las plaquetas liberan sustancias pro- y anti-angiogénicas, siendo

Introducción

reguladas selectivamente por diferentes agonistas. Por otra parte, se podría especular que el endotelio normal o tumoral activado por galectinas es diferencialmente regulado y contribuye a la vascularización tumoral por la estimulación de la liberación de diversos mediadores proangiogénicos (Thijssen *et al.*, 2008; Thijssen *et al.*, 2010; Heusschen *et al.*, 2014).

Curiosamente, el efecto biológico neto parece ser proangiogénico, independientemente del agonista de plaquetas utilizado. Esto implica que el efecto proangiogénico de galectinas a través de las plaquetas contribuye a una retroalimentación positiva que influye en la progresión tumoral. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que, en una alternativa patológica, la contribución de los mediadores derivados de plaquetas antiangiogénicos podrían ganar relevancia. En este sentido, se ha demostrado que la concentración de proteínas reguladoras de la angiogénesis en las plaquetas, aunque es relativamente constante y estable en condiciones fisiológicas, se modifica sustancialmente por la presencia de un tumor en crecimiento (Etulain *et al.*, 2014).

Específicamente se ha demostrado que los cambios en los principales factores antiangiogénicos plaquetarios tales como PF-4 y TSP-1 son *up*-regulados en las plaquetas de los ratones portadores de tumores. A su vez, con respecto a la TSP-1 se ha encontrado un aumento de los niveles de mRNA de TSP-1 en megacariocitos, así como también un mayor número de estas células en la MO de ratones portadores de tumores. Por ello se sugiere que la producción y secreción de moléculas antiangiogénicas plaquetarias podría servir como una respuesta temprana crítica del huésped para suprimir el suministro vascular durante el crecimiento del tumor, haciendo hincapié en el valor potencial de estas moléculas como indicadores del crecimiento tumoral y la regresión. Puesto que la respuesta temprana anti-angiogénica desencadenada por las plaquetas podría ser suprimida durante la progresión tumoral, induciendo un cambio hacia un fenotipo pro-angiogénico de plaquetas, se necesitarían más datos para establecer si los cambios del proteoma plaquetario se producen luego del establecimiento del tumor y por períodos largos (Etulain *et al.*, 2014).

1.1.4. Gal-1 y cáncer

Como se ha mencionado previamente, muchos trabajos de investigación avalan la evidencia de que las células tumorales aumentan la expresión y secreción de Gal-1 respecto de las células normales. Por lo tanto, la expresión de Gal-1 ha sido ampliamente documentada en diferentes tipos de tumores,

Introducción

incluyendo astrocitoma, melanoma, glioma, sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin, carcinoma de próstata, tiroides, colon, mama, pulmón, cabeza y cuello, vejiga y ovario (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

La acumulación de Gal-1 preferencialmente en el estroma peritumoral ha sido descrita para los carcinomas de tiroides, cabeza y cuello, colon, ovario y próstata. Estudios realizados en tumores de colon, páncreas y vejiga indican que los niveles de expresión de Gal-1 son mayores en tumores diferenciados histológicamente e invasivos, respecto a tumores diferenciados o a tejidos normales. En cáncer gástrico y cervical se sabe que existe una correlación positiva entre la expresión de Gal-1 y el estadio tumoral, invasión y metástasis en nódulos linfáticos. Por otro lado, se han obtenido resultados similares en glioblastoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, mama, colon y gástrico, pero se ha encontrado una correlación inversa entre los niveles de expresión de Gal-1 y la supervivencia (Thijssen *et al.*, 2010; Croci *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Laderach *et al.*, 2013; Dalotto-Moreno *et al.*, 2013), resaltando la relevancia de esta lectina como un posible biomarcador o blanco terapéutico en el cáncer.

Se ha demostrado una correlación entre la expresión de Gal-1 y la migración celular e invasión en el carcinoma hepatocelular. La Gal-1 promueve el desarrollo de la polarización de las células del carcinoma hepatocelular a través de las rutas de señalización dependientes de PKA, PI3K y/o ERK1/2MAPK promoviendo el crecimiento tumoral *in vivo*, de manera dosis dependiente. Se ha encontrado sobreexpresión de Gal-1 en tumores de carcinoma hepatocelular, sobre todo durante el proceso metastásico (Espelt *et al.*, 2011).

Recientemente se ha demostrado que en el carcinoma hepatocelular, la Gal-1 induce proliferación y migración de las células endoteliales sinusoidales (Manzi *et al.*, 2016). La Gal-1 activa la transición mesenquimal epitelial, un proceso clave durante la progresión del cáncer hepático (Bacigalupo *et al.*, 2013; 2015; 2017).

Se ha estudiado los efectos de Gal-1 en los enterocitos del intestino delgado humano y de ratón. Se demostró que la Gal-1 se expresa ampliamente en el tejido de la mucosa intestinal, influyendo en la viabilidad de los enterocitos, un efecto que puede influir en la migración de estas células de la cripta, la integridad de las vellosidades y la función de barrera epitelial (Muglia *et al.*, 2016).

Se ha comprobado que el activador tisular de plasminógeno (tPA) ejerce diferentes funciones en la fibrinólisis. En el adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), tPA es sobreexpresado y juega un rol importante en la proliferación, invasión, y angiogénesis. La interacción de tPA con los receptores de la

Introducción

membrana celular se ha relacionado con un mayor incremento de la actividad proteolítica y la transducción de señales a través de mecanismos no enzimáticos (Roda *et al.*, 2009).

A su vez, se sabe que la Gal-1 se expresa fuertemente en células de cáncer pancreático y en fibroblastos tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. En cultivos celulares, la expresión de Gal-1 fue detectada en los alrededores de las células migrantes localizada con tPA. En tumores pancreáticos, Gal-1 y tPA están presentes en la interface entre las células tumorales y los fibroblastos estromales. Se descubrió que la interacción Gal-1/tPA favorece la progresión del cáncer pancreático y se asocia a la producción excesiva de tejido conectivo, rico en fibras de Col, resultado de la activación excesiva de los fibroblastos (desmoplasia). Por lo tanto, en base a estos hallazgos, se propuso que la expresión de Gal-1 en el estroma, al menos en parte, se debería a la secreción de las células pancreáticas cancerígenas, activando de manera paracrina la reacción desmoplástica (**Fig. 1.14**) (Roda *et al.*, 2009).

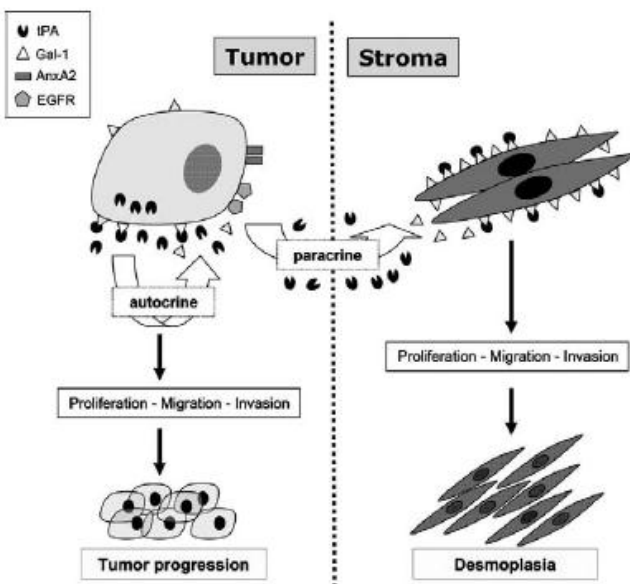


Figura 1.14. Modelo del epitelio estromal en cáncer de páncreas involucraría a tPA y Gal-1

La Gal-1 es sintetizada por células tumorales epiteliales y por fibroblastos. La Gal-1 se concentra en el frente de migración celular y también puede ser secretada al medio extracelular. La unión de tPA a Gal-1 induce la proliferación, migración e invasión. Los efectos pueden ocurrir en los dos tipos de células, generando de esta manera una señalización dual autócrina-parácrina. Tomado de Roda *et al.*, 2009.

A su vez, Thijssen *et al.* (2015) realizaron una revisión sobre 200 trabajos originales, los cuales demostraban la expresión de Gal-1 en pacientes con cáncer, cubriendo la mayoría de tejidos y tipos de cáncer (**Fig. 1.15.A**). Los estudios se centraron en Gal-1 y Gal-3, mientras que los tumores más estudiados fueron los del tracto digestivo y reproductivo. Se evaluaron los estudios que comparaban la expresión de galectinas en tejidos malignos y normales. Con respecto a Gal-1, encontraron que su expresión se encontraba aumentada en tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales o

Introducción

benignos, especialmente en tumores del sistema reproductivo donde hay una clara evidencia de que la transformación va acompañada de una elevada concentración de Gal-1. Este incremento fue observado en tumores estromales, también en tumores del tracto digestivo, incluyendo colon, hígado y páncreas, así como en enfermedades malignas linfoides. También se ha reportado la elevación de Gal-1 en neoplasias mieloproliferativas y en tumores del sistema urinario y respiratorio, cáncer tiroideo y cáncer de piel.

Finalmente, se describe la disminución de la expresión de Gal-1 en tejidos malignos comparados con tejidos normales, sólo en cabeza y cáncer de células escamosas, cáncer uterino y cáncer de vejiga. Sin embargo, estos hallazgos serían contradictorios en relación a otros estudios realizados en los mismos tipos de cáncer, donde las diferencias estarían probablemente más relacionadas con la población de pacientes, subtipo de tumor o metodología utilizada. Por lo tanto, el aumento de la expresión de Gal-1 parece ser un fenómeno común en la mayoría de los tipos de cáncer, aunque las diferencias existen en la localización específica dentro de los diferentes tipos de tumores (Thijssen *et al.*, 2015). (**Fig. 1.15**).

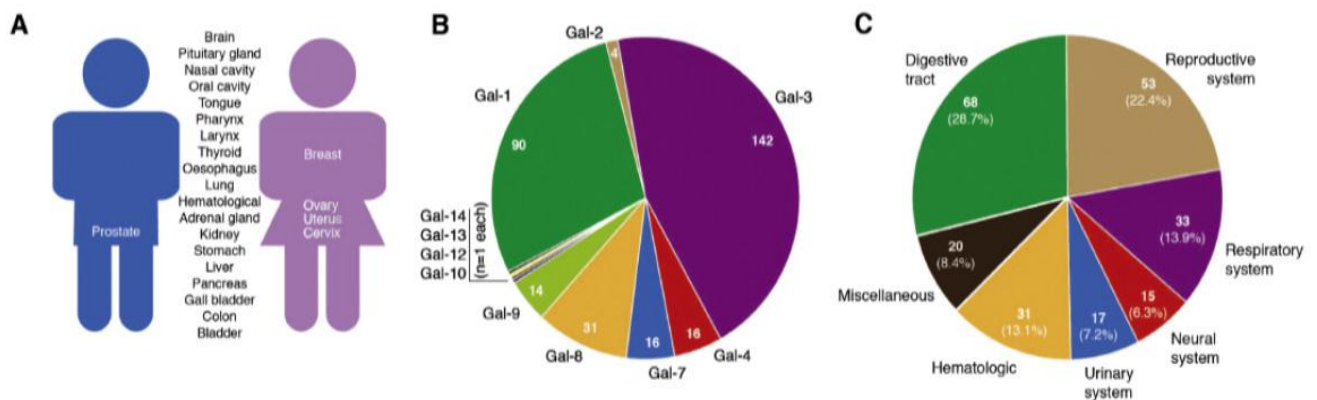


Figura 1.15. Características de los estudios incluidos en la revisión sistemática realizada por Thijssen *et al.* (2015). A) Lista de tejidos en los cuales la expresión de una o más galectinas fueron evaluadas en pacientes con cáncer. B) El gráfico circular muestra el número de estudios donde se analizó la expresión de una galectina específica en pacientes con cáncer. C) Este gráfico muestra la distribución de estudios sobre los diferentes órganos y sistemas de tejidos. Tomado de Thijssen *et al.*, 2015.

Sección 2: Plaquetas

1.2. Introducción

1.2.1. Definiciones

La hemostasia es un mecanismo de defensa que funciona estrechamente ligado a los procesos de reparación tisular y protege la integridad del sistema vascular. La ruptura del fino equilibrio hemostático provocado por múltiples factores termina en la formación de un tapón hemostático formado por plaquetas (trombo primario/ hemostasia primaria) sobre el área lesionada, al que se le añade una malla de fibrina (trombo estable secundario/ hemostasia secundaria).

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas de forma discoide que circulan en una concentración de $1,5$ a $4,5 \times 10^{11}/L$, formadas a partir de los megacariocitos como discos celulares pequeños. Si bien este proceso no ha sido completamente esclarecido, se cree que su función principal es realizar una amplificación génica para incrementar la síntesis de proteínas requeridas para completar la maduración granular y promover el aumento en el tamaño celular (Raslova *et al.*, 2003).

Se sabe que la producción de plaquetas es el evento final de una serie de múltiples procesos que se originan en una célula progenitora pluripotente y que se denomina *megacariopoyesis*. La megariopoyesis se desarrolla a partir de las células madre pluripotenciales (*stem cells*), con capacidad de autoreplicarse y diferenciarse hacia líneas celulares mixtas, como la línea megariocítica. 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. El proceso de formación de plaquetas a partir del megacariocito exhibe algunas características asociadas a la apoptosis, incluyendo la reorganización, la condensación de la membrana y el plegado del citoesqueleto. Estas semejanzas han conducido a investigar si el fenómeno de apoptosis sería una fuerza importante que conduciría a la formación de la proplaqueta y a la liberación plaquetaria (Gordge, 2005).

Se ha llegado a pensar que un proceso apoptótico especializado podría conducir la génesis de la plaqueta y su posterior liberación. A su vez, la apoptosis se ha descrito en los megacariocitos y se ha encontrado que es más prominente en megacariocitos maduros en comparación con las células inmaduras (Falcieri *et al.*, 2000).

Sin embargo, los mecanismos que regulan la apoptosis megacariocítica son poco conocidos, por lo que la transición de megacariocito a plaquetas es compleja. El proceso comienza con la fase mitótica, en la que las células progenitoras megariocíticas se multiplican, y prosigue con una fase endomitótica en la que se producen mitosis nuclear y separación de cromátidas, pero sin división celular. Las sucesivas duplicaciones del ADN originan células poliploides de gran tamaño, los megacariocitos. Posteriormente, una vez alcanzada la ploidía definitiva en la fase final de la megacariopoyesis, se produce la maduración del citoplasma megariocítico que dará lugar, mediante el proceso de la *trombocitopoyesis*, a la formación y liberación de plaquetas (Italiano *et. al*, 2007).

1.2.2. Formación de plaquetas

1.2.2.1. Trombopoyesis

Si bien desde principios del siglo XX se reconoce que las plaquetas derivan de los MCs, el mecanismo por el cual se forman y liberan a la circulación permaneció inexplorado durante muchos años. Para explicar este proceso se propusieron diferentes modelos que incluían el brote de las plaquetas desde la periferia del MC, la fragmentación citoplasmática a partir del sistema de demarcación de membrana (SDM) y la liberación de procesos proplaquetarios que luego generarían plaquetas individuales. El modelo actualmente aceptado propone que la biogénesis plaquetaria ocurre mediante la formación de dos intermediarios entre el MC maduro y las plaquetas libres, las proplaquetas y las preplaquetas (Thon *et. al.*, 2010).

Este modelo plantea que los MCs maduros extienden troncos citoplasmáticos largos y ramificados denominados proplaquetas. Estas extensiones están compuestas por engrosamientos en tándem del tamaño de plaquetas conectados por finos puentes citoplasmáticos. Las primeras evidencias registraron múltiples imágenes de proplaquetas extendiéndose dentro de sinusoides medulares. Luego, estas estructuras proplaquetarias fueron obtenidas de manera espontánea a partir de cultivos *in vitro* de MCs derivados de células madre hematopoyéticas humanas (CMH) de hígado fetal murino (Thon *et. al.*, 2010) y de CMH estimuladas con el factor de crecimiento específico del linaje megacariocítico/plaquetario (Pozner *et. al*, 2005).

Durante la formación y extensión de las proplaquetas el MC concentra todo su citoplasma en las extensiones proplaquetarias. Este proceso comienza con la erosión de uno de los polos del citoplasma causando la formación de pequeños pseudópodos. A continuación, estos pseudópodos comienzan a

Introducción

elongarse formando finos túbulos de diámetro uniforme mientras se ramifican y se forman engrosamientos a lo largo de toda su longitud. Estas ramificaciones se condensan en la forma lamelar y vuelven a dividirse, amplificando de esta manera el número de ramificaciones en cada ciclo de conversión lamelar/ramificación. Eventualmente, las proplaquetas se desprenden del cuerpo del MC y éste se transforma en un núcleo residual rodeado por una red de extensiones proplaquetarias (**Fig.1.16**) (Italiano *et al.*, 1999).

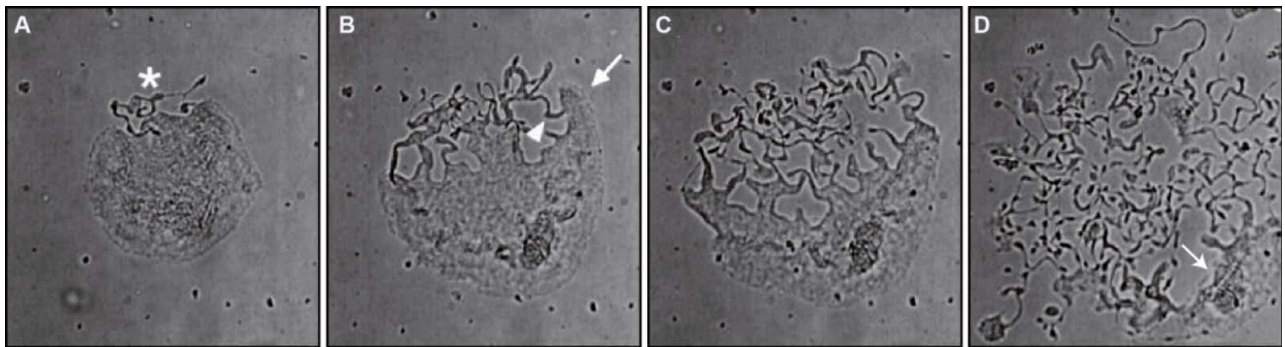


Figura 1.16. Generación de proplaquetas. Secuencia de fotos que muestra los eventos esenciales que llevan a la formación de proplaquetas *in vitro*. (A) La producción de proplaquetas comienza cuando el citoplasma del MC se erosiona en un polo (asterisco blanco). (B y C) Las proplaquetas (flecha blanca) se extienden a lo largo del cuerpo del MC a medida que se extienden y ramifican. (D) Finalmente, las proplaquetas se contraen y se separan del cuerpo celular residual del MC (flecha blanca). **Tomado de Italiano *et al.*, 1999.**

Se sabe que la fuerza necesaria para la extensión de los procesos proplaquetarios es provista por el citoesqueleto de tubulina y actina (A). Dentro de las diferentes isoformas de tubulina, la $\beta 1$ es la principal en los MC y su reorganización es esencial para la formación y extensión de las proplaquetas (Lecine *et al.*, 2000).

Cuando el MC comienza a generar las estructuras proplaquetarias, los microtúbulos se organizan de manera cortical formando haces gruesos por debajo de la membrana plasmática. Luego comienzan a extenderse pseudópodos y los microtúbulos forman arreglos lineales que se prolongan por toda la longitud de la proplaqueta. El extremo más distante de cada uno de estos trozos tiene un engrosamiento del tamaño de una plaqueta que contiene un anillo de microtúbulos delimitando a una plaqueta naciente (Thon *et al.*, 2010).

Se sabe que además de participar en la elongación de las proplaquetas, los microtúbulos también permiten el transporte de organelas y gránulos dentro de las proplaquetas. Estas estructuras intracelulares se asocian a proteínas motoras (como la kinesina) y son enviadas individualmente desde

Introducción

el cuerpo del MC hacia el interior de las proplaquetas, moviéndose bidireccionalmente hasta que son capturadas por el extremo proplaquetario (Richardson *et al.*, 2005).

En cuanto al citoesqueleto de actina, su función sigue siendo estudiada: se sabe que la F-actina se encuentra presente a lo largo de toda la proplaqueta y es la encargada de generar el curvamiento inicial para que se genere una bifurcación proplaquetaria. Una vez que los engrosamientos proplaquetarios contienen todos los componentes de una plaqueta funcional, las proplaquetas son escindidas del cuerpo del MC y liberadas hacia el torrente sanguíneo (Junt *et al.*, 2007).

Hace unos años se describió un nuevo intermediario de la biogénesis plaquetaria conocido como preplaqueta. Estas estructuras fueron encontradas en sangre periférica, tienen mayor tamaño que una plaqueta madura y pueden presentar forma circular o de mancuerna, las cuales son interconvertibles entre sí y permiten a las preplaquetas mezclar y volver a distribuir el contenido granular. Finalmente, la forma de mancuerna se escinde por su parte central dando lugar a dos plaquetas libres (**Fig. 1.17**) (Italiano *et. al.*, 2013).

Diferentes trabajos han fortalecido este modelo de generación de plaquetas, aunque recientemente Nishimura *et al.* (2015) demostraron que cuando existe una necesidad aguda de plaquetas los MCs son capaces de liberar plaquetas funcionales a través de un mecanismo regulado por la IL-1 α pero sin formar pre- ni proplaquetas. Mediante este proceso el rendimiento de plaquetas es aproximadamente 20 veces mayor que el que se obtiene mediante la formación de proplaquetas. De esta manera, durante el estado estacionario la trombopoyesis respondería al modelo proplaquetario regulado por trombopoyetina (TPO), mientras que, ante una necesidad extrema de plaquetas se activaría este nuevo mecanismo dependiente de IL-1 α .

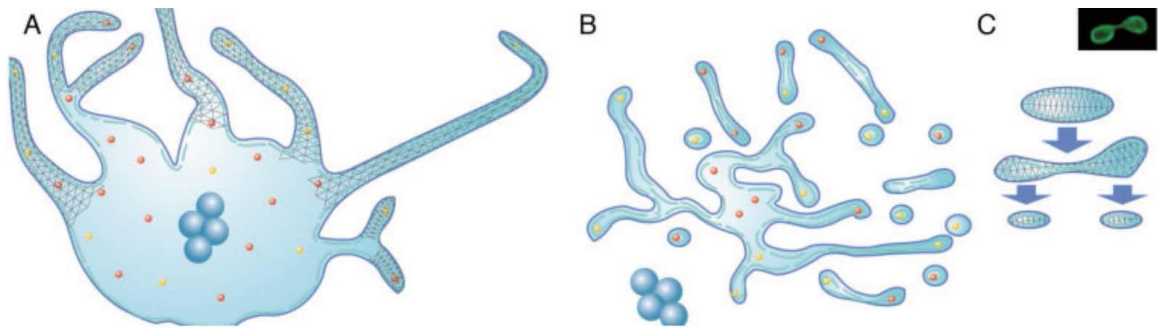


Figura. 1.17. Modelo de producción de plaquetas. (A) Las proplaquetas se extienden utilizando el citoesqueleto de tubulina. El final de cada proplaqueta contiene un engrosamiento del tamaño de una plaqueta y las mitocondrias y gránulos (esferas amarillas y naranjas) son transportadas hacia dichos extremos. (B) El MC completo se convierte en proplaquetas que son liberadas a circulación a través de los sinusoides medulares. (C) Las proplaquetas en circulación se transforman en preplaquetas, las cuales adoptan la forma circular o de mancuerna. Esta última se escinde por el centro para liberar dos plaquetas individuales. **Tomado de Italiano, 2013.**

A pesar de los grandes avances logrados en el conocimiento de este proceso, existen aún numerosos interrogantes acerca de la trombopoyesis, como por ejemplo cuáles son las señales que inician el proceso de formación de proplaquetas o los mecanismos que llevan a su fragmentación para formar las preplaquetas. Incluso, se desconocen las fuerzas que promueven que las preplaquetas en forma de mancuerna se escindan para dar lugar a las plaquetas funcionales tal y como se las conoce.

1.2.2.2. Biogénesis plaquetaria en la médula ósea

La médula ósea (MO) es un tejido complejo protegido por los huesos dedicado a la producción de los diferentes tipos celulares que componen la sangre. Dentro de las cavidades de los huesos, la MO se constituye como una red tridimensional de sinusoides ramificados, rodeados por colonias de células hematopoyéticas inmersas en una malla de componentes de la matriz extracelular y factores humorales (**Fig. 1.18**) (Morrison, 2014).

Introducción

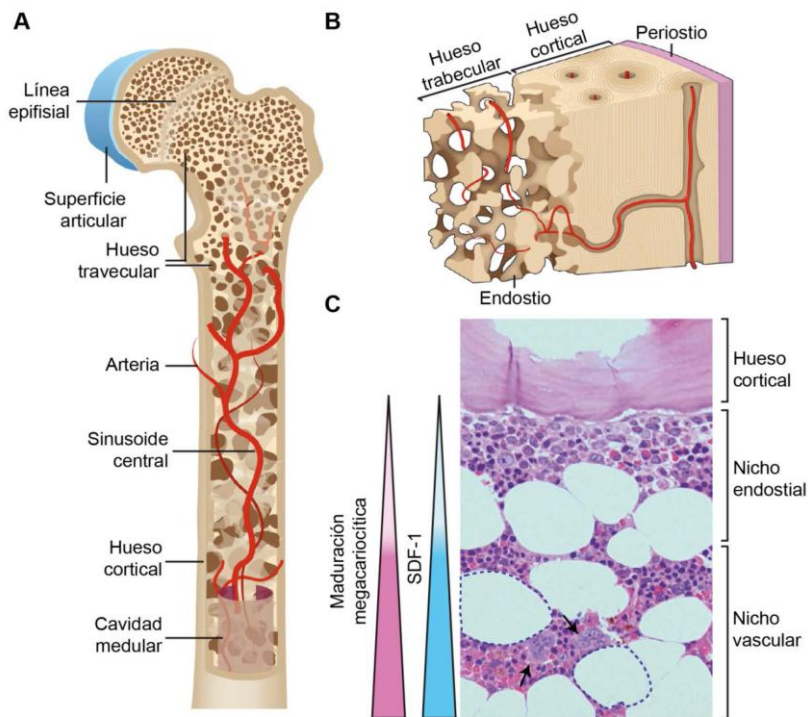


Figura 1.18. Anatomía de la médula ósea. Las CMH en un humano adulto residen principalmente dentro de la MO que es un órgano complejo que contiene diferentes tipos celulares, tanto hematopoyéticos como no hematopoyéticos.

(A) Anatomía de un hueso con las diferentes partes que lo conforman. (B) La interfase entre el hueso y la MO se denomina endostio. Esta estructura se encuentra cubierta de células que recubren el hueso incluyendo osteoblastos y osteoclastos. Las arterias transportan oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento dentro de la MO y se extienden hasta coalescer en un sinusoide central que conforma la circulación venosa. Los sinusoides son vénulas especializadas que componen una red reticular de vasos fenestrados que permiten que las células entren y salgan a circulación. (C) Arquitectura funcional de la MO. La maduración megacariocítica ocurre desde el nicho endostial al vascular en una migración regulada principalmente por el gradiente de citoquinas y quemoquinas. Los MCs maduros (flechas negras) se apoyan sobre sinusoides (línea punteada azul) para liberar proplaquetas a la circulación.

SDF-1: *Stroma-derived Factor-1*.

Tomado de Morrison, 2014.

Las células que componen el estroma medular incluyen osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, células reticulares no fagocíticas (incluyendo miofibroblastos y células adventicias sinusoidales) y células madre mesenquimales. Por lo tanto, las células estromales de la MO regulan la hematopoyesis a través de la expresión de citoquinas u otras macromoléculas solubles o unidas a membrana, contra receptores para integrinas y otras moléculas de adhesión presentes en la superficie de las células hematopoyéticas. Se sabe que, dentro de la MO, los mecanismos de diferenciación celular y tránsito hacia el torrente sanguíneo están estrictamente regulados para satisfacer los diferentes requerimientos fisiológicos. La arquitectura medular permite reconocer diferentes nichos cuyo microambiente mantiene y regula un tipo particular de célula progenitora. En base a la composición y localización de los diferentes tipos celulares se definen dos microambientes o nichos medulares. Uno vascular, compuesto principalmente por células endoteliales, células reticulares y células estromales mesenquimales llamado *nicho vascular* y otro asociado al endostio (interfase entre el hueso y la MO)

Introducción

compuesto por osteoblastos o células de su linaje llamado *nicho osteoblástico o endostial* (Kaushansky *et al.*, 2015).

Desde la antigüedad, los MCs se asociaron al *nicho vascular* donde fueron observados adyacentes a sinusoides medulares tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, estudios más recientes demostraron que estas células pueden estar ubicadas en porciones anatómicas diferentes asociándose tanto al *nicho vascular* como al *osteoblástico* (Malara *et al.*, 2014). Por lo tanto, el modelo actual propone que a medida que los MCs maduran, migran del *nicho osteoblástico* al *vascular* para finalmente liberar desde allí las proplaquetas a la circulación (Malara *et al.*, 2015).

Se sabe que el colágeno (Col) tipo I es el componente más abundante del nicho osteoblástico; cabe destacar que la unión de MCs a este tipo de Col inhibe la formación de proplaquetas, hecho que sugiere que el *nicho osteoblástico* impediría de esta manera la formación de dichas estructuras en condiciones fisiológicas. Esta hipótesis está sostenida por recientes investigaciones en las que, utilizando un modelo de co-cultivo de osteoblastos junto con CMH, se observó que las células forman un nicho que favorece la deposición de Col tipo I y crea un entorno que promueve su diferenciación al linaje megacariocítico pero no permite completar su maduración ni que se extiendan las proplaquetas (Pallotta *et al.*, 2009).

Estos hallazgos nos llevan a establecer que el Col tipo I en el *nicho osteoblástico* actuaría como supresor de la formación de proplaquetas permitiendo al mismo tiempo que la MCp (megacariopoyesis) ocurra en sus primeros estadios de diferenciación. Durante los estadios finales de la biogénesis plaquetaria, los MCs se localizan en las cercanías de sinusoides medulares en donde entran en contacto con una gran variedad de citoquinas y quimocinas que son producidas y liberadas por los diferentes tipos celulares del nicho vascular. Dentro de ellas, el factor derivado del estroma 1 α (SDF-1 α , del inglés *Stroma-derived Factor-1 α*) fue la primera quimocina implicada en el direccionamiento de los MCs hacia el *nicho vascular*. El SDF-1 α regula la migración de los MCs a través de su receptor específico, el CXCR4, por lo que su expresión durante la MCp está delicadamente regulada. Finalmente, la importancia de esta quimocina en la MCp fue demostrada por Avecilla *et al.* (2004), quienes observaron el restablecimiento de la trombopoyesis en ratones *knock out* para la TPO y su receptor mediante el suministro de SDF-1 α en conjunto con el factor de crecimiento de Fb.

Relacionado con estos estudios, recientemente se ha reportado que la administración de SDF-1 α o el uso de fármacos que propician un aumento de su estabilidad a nivel endógeno favorecen la

Introducción

asociación de los MCs con los sinusoides medulares y consecuentemente la generación de plaquetas. En particular, utilizando un modelo de injuria por irradiación, se demostró que la fluctuación dinámica en la distribución espacial y temporal del SDF-1 α se correlaciona con el posicionamiento de los MCs dentro del *nicho vascular* (Niswander *et al.*, 2014).

Relacionado con este hallazgo, se ha demostrado que algunas señales angiogénicas también se encuentran involucradas en la relocalización de los MCs en el nicho vascular provocando un aumento de la producción plaquetaria. Por lo tanto, la idea de los MCs como células estáticas de la MO ha ido evolucionando hacia un *modelo dinámico* en el cual estas células maduran a medida que migran por los diferentes nichos dirigidos por estímulos específicos. De este modo, el *nicho osteoblástico* proporciona un entorno que permite que los precursores megacariocíticos proliferen, se diferencien y comiencen a madurar, mientras que el *nicho vascular* promueve principalmente la trombopoyesis (Ru *et al.*, 2016).

Por otro lado, se sabe que la diferenciación de las células madre precursoras hematopoyéticas que expresan la glicoproteína 34 en superficie como molécula de adhesión (CD34⁺), en presencia de células mesenquimales del estroma de MO (MSC), aumentan la producción de MC, proplaquetas y plaquetas. Se observó un enriquecimiento en una población precursora de MC exhibiendo un nivel intermedio de positividad CD41 (integrina α 2b o GPIIb, es una glicoproteína transmembrana que se expresa en megacariocitos y plaquetas), manteniendo su expresión de CD34. Siguiendo la clasificación y el sub-cultivo con MSC, esta población de células CD34⁺/CD41 fue capaz de generar de manera eficiente MC portadores de proplaquetas y plaquetas. Del mismo modo, SR1, un antagonista del receptor de aril hidrocarburos (AHR), factor de transcripción que mantiene la expresión de CD34 de las células progenitoras, condujo a una fracción enriquecida en CD34⁺/CD41 y a una mayor capacidad de generar elementos MC y plaquetas como proplaquetas productoras ultraestructural y funcionalmente similares a las plaquetas circulantes. El efecto de MSC, como el de SR1, parece estar mediado por un mecanismo de AHR dependiente, ya que ambas condiciones de cultivo resultaron en la represión de su efector CYP1B1. Este aislamiento recientemente descrito de un precursor que presenta un fuerte potencial MC podría ser explotado para estudiar trombopoyesis normal y anormal, así como también la producción de plaquetas *in vitro* (Strassel *et al.*, 2016).

1.2.2.3. Regulación humoral de la megacariopoyesis

Antiguamente se consideraba que el desarrollo de los MC y MCp, al igual que el de otros linajes celulares sanguíneos, requería de la acción de al menos dos factores humorales distintos: uno de acción temprana, promotor de la proliferación celular y otro, más tardío, capaz de estimular la maduración. Los primeros hallazgos demostraron que tanto las interleuquinas (IL)-3, 6 y 11 como el factor de crecimiento de células madre (SCF, del inglés *stem cell factor*) eran capaces de estimular los estadios iniciales de la MCp. Sin embargo, no se logró identificar un factor destinado a la maduración final de estas células hasta 1994, donde el concepto fue reemplazado por una teoría unificadora gracias a que varios grupos de trabajo, mediante diferentes estrategias experimentales, pudieron sentar las bases que permitieron establecer que el principal factor humoral responsable del desarrollo megacariocítico/plaquetario era la trombopoyetina (TPO) y que su receptor era el c-mpl. Estos hallazgos dieron inicio a una nueva era de sistemas de cultivo que permitieron estudiar la biogénesis plaquetaria y comprender mejor todos los procesos implicados (Kaushansky, 2015).

El primer paso para el descubrimiento del eje TPO/c-mpl fue a fines del siglo pasado, a través de la identificación del virus responsable de la leucemia mieloproliferativa murina denominado MPLV (del inglés *Myeloproliferative Leukemia Virus*). Luego fue reportado el oncogén transformante (v-mpl) y gracias a este hallazgo, fue clonado el correspondiente proto-oncogen celular humano (c-Mpl). Esta proteína fue posteriormente clasificada dentro de la superfamilia de receptores para factores de crecimiento y a su vez dentro de la subfamilia “tipo I” (junto con los receptores para eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento granulocítico (G-CSF), factor de crecimiento granulo-monocítico (GM-CSF) y las IL-1 a la 7, entre otras), ya que carece de actividad quinasa intrínseca. El gen del c-mpl humano está compuesto por 12 exones que codifican para una proteína de 635 aminoácidos (aa) y 71 kDa. La unión de la TPO con su receptor no sólo afecta la biogénesis plaquetaria, sino que también regula los niveles de TPO, así como la expresión de c-mpl. De hecho, luego de la unión de la TPO al c-mpl de plaquetas y MC, el complejo es internalizado, degradado en el proteasoma y parcialmente reciclado hacia la superficie (Dahlen *et al.*, 2003).

Se sabe que este mecanismo dinámico es fundamental en la regulación de los niveles de TPO medulares y plasmáticos. De esta manera, durante el estado estacionario, es decir cuando la cantidad de plaquetas circulantes se mantiene constante, la concentración de TPO plasmática es regulada por la masa de MC y por las plaquetas (Kaushansky, 2005).

Introducción

La TPO que logra ingresar en la MO, así como la que es producida en la propia médula, puede ser unida por células de todos los estadios del desarrollo megacariocítico, aunque recientemente se observó en ratones que las únicas células que requieren TPO para continuar en el camino del desarrollo de MC son los progenitores más tempranos (Ng *et al.*, 2014).

Se sabe que la interacción TPO/c-mpl es la principal responsable del crecimiento y desarrollo de MC a partir de la CMH. Entre sus principales funciones biológicas se puede destacar que aumenta el número y tamaño de MC, estimula la expresión de glicoproteínas y gránulos plaquetarios específicos, es el principal estímulo de la endomitosis y poliploidización de MC y promueve el desarrollo del sistema de demarcación de membranas (SDM). Por lo tanto, como consecuencia de la eliminación génica de este factor de crecimiento (al igual que la de su receptor) se produce una severa trombocitopenia, presentando una reducción de más del 95% de los progenitores comisionados al linaje megacariocítico en la MO. Por otro lado, se sabe que en situaciones en las que el sangrado o el consumo llevan a un descenso en el número de plaquetas circulantes, el consiguiente aumento de los niveles de TPO que logran alcanzar la MO permite que una mayor proporción de progenitores tempranos sean comisionados al linaje megacariocítico o que se complete el desarrollo de MC. El resultado, luego del retardo que demanda que los MC maduren (hasta 12 días en el humano), es un aumento de la producción de plaquetas que inicialmente supera incluso los niveles previos y luego se normaliza. Por lo tanto, en general se acepta que, en condiciones fisiológicas, la biogénesis plaquetaria es controlada por un fino equilibrio regulado por las células terminales e iniciales de este proceso, manteniendo los niveles de plaquetas circulantes en un estado estacionario que puede variar considerablemente entre individuos (los adultos normales tienen plaquetas entre 150 y $450 \times 10^9/L$ de sangre) y especies (por ejemplo los ratones tienen alrededor de $1000 \times 10^9/L$ de sangre). En base a este mecanismo de autorregulación, aquellas condiciones clínicas que presentan un recuento de plaquetas disminuido y una menor masa de MC medulares (como ocurre en la anemia aplásica) pueden ser explicadas por altos niveles plasmáticos de TPO, debido a la limitada cantidad de c-mpl disponible para unirla. Sin embargo, esta correlación no se mantiene en otras trombocitopenias asociadas a patologías como los síndromes mielodisplásicos y la trombocitopenia inmune (TPI), siendo aún no dilucidadas las causas de estas diferencias (Kaushansky, 2015).

1.2.2.4. Mecanismos de señalización involucrados en la megacariopoyesis

La interacción entre la TPO y el c-Mpl promueve su dimerización. Al igual que otros receptores para citoquinas, la fosforilación de tirosinas es esencial para la iniciación de la señal y los subsecuentes eventos de transducción. A diferencia de aquellos receptores para factores de crecimiento hematopoyéticos que presentan actividad de tirosina-quinasa intrínseca, la fosforilación del c-Mpl es debida a una tirosina-quinasa citoplasmática denominada JAK2 que se activa como consecuencia del cambio en la conformación del c-Mpl luego de su unión con la TPO (Drachman *et al.*, 2002).

La activación de JAK2 promueve la fosforilación de los residuos de tirosina en la porción distal del c-Mpl, generando un sitio de reclutamiento de proteínas SH2. De esta manera, la unión de la TPO al c-Mpl desencadena varios eventos de señalización críticos que median los efectos de este factor de crecimiento sobre células hematopoyéticas humanas: fosforilación y activación de un grupo de proteínas denominado STATs (del inglés *Signal Transducers and Activators of Transcription*). Por lo tanto, las STATs fosforiladas se dimerizan, translocan al núcleo y estimulan la transcripción de genes específicos, con activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI₃K) que activa Akt (también llamada PKB), que está implicada en la proliferación celular dependiente de ciclinas a través del factor nuclear-kappa B con activación del eje Ras/RAF/MEK/ERK, cuyo resultado final es la fosforilación de los factores nucleares c-Jun, c-Fos y Elk1, los cuales promueven principalmente la endomitosis de MC (Miyakana *et al.*, 2001).

A su vez, se sabe que además de los efectos descritos en MC y sus precursores inmediatos, la TPO también permite la supervivencia de CMH y actúa en forma sinérgica con la IL-3 y el SCF para inducir la entrada de estas células al ciclo celular resultando en un aumento de la producción de CMH y células progenitoras comisionadas de todos los linajes. De esta manera, los efectos inhibitorios a nivel de todos los estadios de la MCp, la supresión génica de TPO o de su receptor se asocia con una reducción significativa de los valores normales del número de células progenitoras de otros linajes, afectando principalmente al eritroide.

1.2.3. Morfología plaquetaria

Mediante la observación por microscopía óptica de los extendidos realizados con sangre entera anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y teñidos con la tinción de May Grünwald

Introducción

Giemsa (MGG), las plaquetas aparecen como cuerpos grises azulados, ovals o redondos, pequeños, con varios gránulos púrpura-rojizos. El diámetro medio de las plaquetas varía en diferentes individuos, extendiéndose a alrededor de 1.5 a 3.0 μm , equivalente aproximadamente de un cuarto hasta la mitad del eritrocito. Hay también una variabilidad considerable en el tamaño de plaquetas de un mismo individuo; en ocasiones las plaquetas de muestras de individuos normales tienen diámetros grandes, cercanos al tamaño de los eritrocitos. El histograma de volumen plaquetario (7-9 μl) está representado por una distribución normal logarítmica, aún en poblaciones con un número incrementado de plaquetas recién formadas. Esta observación ha sido considerada una evidencia de que la heterogeneidad plaquetaria está determinada por su formación y no es consecuencia del envejecimiento. El estudio de la ultraestructura de las zonas centrales y de constricción a lo largo de las proplaquetas confirma la dispersión de tamaños: son pequeñas cuanto más distales del cuerpo celular y más grandes las que provienen del centro citoplasmático. La ultraestructura plaquetaria está subdividida en tres partes topográficas relacionadas con su función (**Fig. 1.19**): la membrana plaquetaria intra y extracelular, los gránulos y organelas intracitoplasmáticos y el conjunto de proteínas motoras del citoesqueleto (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

Las plaquetas activadas pueden tener tres o cuatro filamentos largos, que se proyectan fuera del cuerpo de la misma (filopodios). La microscopía electrónica revela una capa poco definida (glicocálix) que se extiende sobre la superficie de la plaqueta, de 14 a 20 nm, que puede estar compuesta por las glicoproteínas de la membrana, glicolípidos, mucopolisacáridos y proteínas fijadas por adsorción del plasma (Reineri *et al.*, 2007).

La superficie de la plaqueta presenta un número de huecos y hendiduras que se relacionan con el sistema canalicular abierto (SCA), que consta de un elaborado sistema de canales, compuesto de invaginaciones de la membrana plasmática que se extienden por toda la plaqueta. Por lo tanto, durante la activación plaquetaria, el contenido de los gránulos se vuelca al exterior, por fusión de los mismos a alguna región del sistema canalicular abierto o de la membrana plasmática (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

Introducción

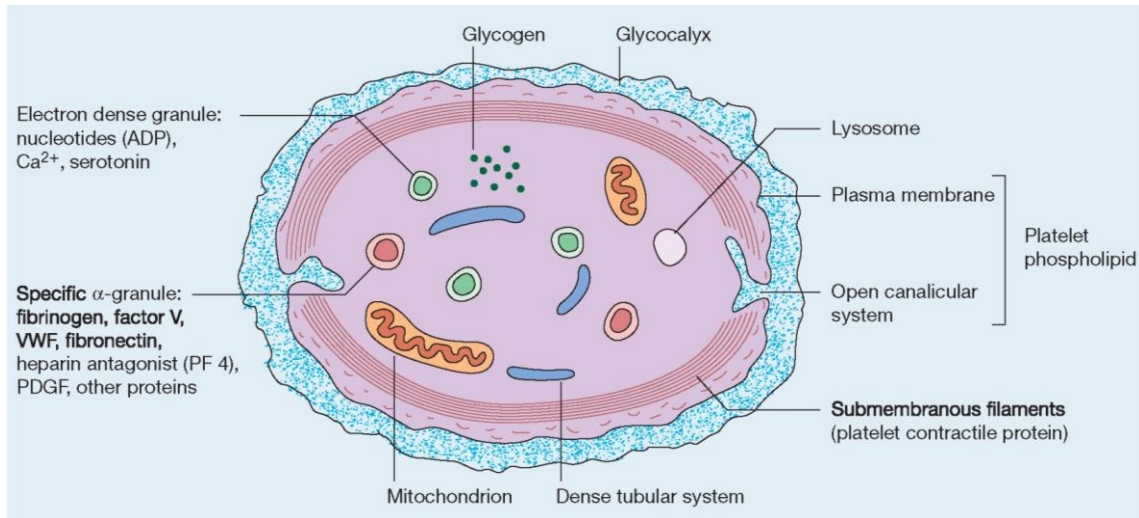


Figura 1.19. Ultraestructura plaquetaria. ADP, difosfato de adenosina; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PF, factor plaquetario; vWF, factor de von Willebrand. **Tomado de Hoffbrand's Essential Haematology, 2016.**

1.2.3.1. Membrana plaquetaria

La plaqueta está rodeada por una membrana plasmática que se extiende a través de múltiples ramificaciones del sistema canalicular conectado a la superficie (SCCS). A nivel de microscopía electrónica, la membrana plaquetaria tiene un espesor de 20 nm y aparece como una unidad trilaminar de membrana formada por dos hojas densas separadas por un espacio constante. Al igual que otras membranas biológicas está compuesta por proteínas y lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol. El glicocálix o cubierta plaquetaria está formado por cadenas de oligosacáridos provenientes de glicolípidos, glicoproteínas de membrana (GPs) y cadenas de polisacáridos provenientes de proteoglicanos de membrana. Además, proteoglicanos plasmáticos y proteínas tales como la albúmina (Alb) y el Fb forman parte del glicocálix y son incorporados por adsorción. La asociación entre la membrana plaquetaria y los depósitos de proteínas plasmáticas constituye la primera línea de interacción de la plaqueta con su entorno y participa activamente en el proceso de endocitosis y almacenamiento de proteínas plasmáticas en los gránulos de secreción. El glicocálix es responsable de la carga negativa en la superficie plaquetaria, que provoca la repulsión de interacciones “no deseadas” con otros elementos de la pared vascular o de la circulación sanguínea (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

Las invaginaciones de la membrana plaquetaria (MP) dan origen a un sistema de canales y

canalículos que forma una extensa malla dentro del volumen citoplasmático. En esa superficie invaginada, el glicocáliz está menos desarrollado; un ejemplo de ello es la mínima presencia de la glicoproteína Ib (GPIb) comparada con la existente sobre la superficie celular. Además, las cadenas glicosiladas de las moléculas descritas constituyen un bloqueo del SCCS, formando un filtro que controla la entrada de proteínas plasmáticas (White *et al.*, 2006).

Durante la activación plaquetaria y 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. Se sabe que las GPs 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. Por lo tanto, la composición de la membrana plasmática depende del estado de activación de la plaqueta (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

1.2.3.2. Sistema de membrana

1.2.3.2.1. Sistema canalicular abierto

El sistema canalicular abierto (SCA) consta de una serie complicada de conductos que comienzan como indentaciones de la membrana plasmática y recorren el interior de la plaqueta. Se sabe que el sistema canalicular abierto es contiguo con el exterior de la plaqueta, a pesar de que sus elementos puedan aparecer como vesículas cerradas o vacuolas en las plaquetas analizadas en el microscopio electrónico. El SCA tiene varias funciones; entre ellas proporciona un mecanismo de entrada de elementos externos al interior de la plaqueta, pero también representa 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. Sin embargo, aún hay controversia respecto a la frecuencia relativa con la que tiene lugar la secreción a través del sistema canalicular abierto frente a la fusión directa con la membrana plasmática (Heijnen & van der Sluijs, 2015).

El SCA también representa un importante depósito interno de la membrana. La mayor parte de la membrana del sistema canalicular abierto 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 sólo 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 glucoproteínas de la membrana plasmática. Por ejemplo, en determinadas situaciones la activación plaquetaria por parte de la Tr da lugar a la pérdida consistente y selectiva de GPIb/IX de la superficie de la plaqueta; la microscopía electrónica muestra que la GPIb/IX está secuestrada en el SCA. La plasmina puede producir un fenómeno similar. La activación de la plaqueta produce un aumento en la $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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 los receptores de $\alpha_{IIb}\beta_3$ en las membranas de los cuerpos densos y del SCA (Niu *et al.*, 2012).

1.2.3.2.2. Sistema tubular denso

Está formado por una red de canales cerrados del retículo endoplásmico residual caracterizado histoquímicamente por la presencia de actividad peroxidasa. Los canales del sistema tubular denso (STD) son menos extensos que los del SCA y tienden a agruparse en regiones estrechamente conectadas con este último. 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 90 nM y liberarlo cuando las plaquetas son activadas. La calreticulina, una proteína que se une al calcio, localizada en el STD, ayuda a secuestrar calcio (Jalal *et al.*, 2012).

La membrana del STD también parece ser 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.

1.2.3.3. Gránulos de secreción

Las plaquetas contienen cuatro tipos de gránulos citoplasmáticos, clasificados de acuerdo a su ultraestructura, densidad y contenido: los gránulos α , los gránulos densos, los lisosomas y los peroxisomas, que se describen a continuación.

1.2.3.3.1. Gránulos α

Los gránulos α son los más prominentes y los que se encuentran en mayor número, entre 50 a 80 por plaqueta, aproximadamente. Se forman durante la maduración temprana de los megacariocitos y aparecen en la malla trans-Golgi en forma de pequeñas vesículas y de gránulos inmaduros que transitan a través de cuerpos multivesiculares hasta alcanzar su tamaño y densidad definitiva. Los gránulos maduros son generalmente redondos u ovoides, su diámetro es de 200 a 500 nm y están rodeados por una unidad de membrana. La ultraestructura es muy característica, la matriz puede dividirse en tres zonas con diferentes densidades. En la zona nucleoide oscura (denominada núcleo *ídee*), frecuentemente con un área excéntrica de densidad electrónica acentuada, se observa colocalización de proteoglicanos con proteínas plaquetarias específicas tales como la β -trombomodulina y el factor plaquetario cuatro (PF4). La zona clara, localizada en la periferia y en forma opuesta a la anterior, contiene una a cinco estructuras tubulares de 20 a 25 nm, regularmente espaciadas y alineadas. En estas estructuras se observa colocalizado el vWF en su forma multimérica de alto peso molecular. Finalmente, una tercera zona intermedia está asociada con la marcación para Fb, TPS-1, Alb y factores de crecimiento (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

El FP4 o CXCL4 y la familia de la β -tromboglobulina (β -TG) están presentes en los gránulos α en concentraciones aproximadamente 20.000 veces superiores que sus concentraciones plasmáticas. En áreas más electrotransparentes se encuentran los elementos tubulares en los que se localizan preferentemente el vWF, la multimerina I (MMRN1) y el factor V. Los gránulos α contienen proteínas adhesivas, factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, proteoglicanos e inmunoglobulinas. Las proteínas pueden agruparse según su función en *proteínas adhesivas*: vWF, fibrinógeno (Fb), fibronectina (Fn), vitronectina (Vn), trombospondina-1 (TSP-1) y laminina-8, *proteínas de coagulación*: FV/FVa, Factor XI, PS: proteína S, kalicreínas de alto peso molecular (HMWK), antitrombina y *otras proteínas*: plasminógeno (PLG), inhibidor del PLG activado (PAI-I), α 2-antiplasmina, inhibidor del factor tisular activado (TAFI) y proteínas relacionadas con la angiogénesis (FP4) (Chen *et al.*, 2017).

La membrana de los gránulos α contiene diferentes receptores moleculares, cuyos sitios de reconocimiento a ligandos están orientados hacia su lado interno. Algunos como la P-selectina, la osteonectina y el GMP33 son receptores específicos y están ausentes en la membrana plasmática de la plaqueta en reposo. En particular, la P-selectina es indicadora de activación plaquetaria cuando se la

Introducción

encuentra expresada en la superficie celular (Furie *et al.*, 2001).

Se sabe desde hace tiempo que varios receptores están presentes en ambas membranas; el ejemplo más relevante corresponde al complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$, otros (CD9, PECAM-1, y GPIV) están presentes en porcentajes menores y el complejo GP Ib/IX/V sólo en trazas. La comprensión del rol de los gránulos α en la fisiología plaquetaria se dilucidó mediante el estudio del *síndrome de la plaqueta gris*, una enfermedad congénita poco frecuente. En estos pacientes las plaquetas contienen gránulos α anormalmente vacíos, constituidos por membranas, pero sin contenido soluble. El origen de esta anomalía se observa en los megacariocitos en los que las proteínas de la matriz granular de origen endógeno se liberan en grandes cantidades hacia el espacio extracelular contenido en el lumen del sistema de demarcación de membrana. Las plaquetas de estos pacientes adquieren un aspecto grisáceo luego de la tinción de Romanowsky y tienen una agregación disminuida en presencia de Col y Tr *in vitro*. Por lo tanto, estas plaquetas han constituido un modelo útil para la comprensión de la participación de los gránulos α en la hemostasia (Nurden *et al.*, 2008).

Con respecto al factor plaquetario 4 (FP4), se sabe que se trata de una quimocina de la familia CXC que no contiene la secuencia conservada Glu-Leu-Arg (ELR). Se piensa que existe como un trémero FP4 complejado con un proteoglicano como transportador. Después de que el FP4 es liberado por la plaqueta, se une a moléculas similares a heparina en la superficie de las células endoteliales, por lo que la administración de heparina puede movilizar el almacenamiento del factor. El FP4 también se une a los hepatocitos, que lo captan y lo catabolizan. El FP4 es un quimiotáctico débil para el neutrófilo y para el fibroblasto; inhibe la angiogénesis probablemente mediante la inhibición de la proliferación de la célula endotelial (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

Otra proteína contenida en estos gránulos es la multimerina I (MMRN1), constituida por una familia de homomultímeros unidos por puentes disulfuro, que oscilan en tamaño desde PM: 450 kDa hasta muchos millones de daltons. Se considera que el multímero es un trémero de una única unidad de PM: 167 o 150 kDa, que se sintetiza en los megacariocitos y en las células endoteliales y se almacena en los gránulos α de las plaquetas. La multimerina se une al factor V y al factor Va; todo el factor Va biológicamente activo está unido a la multimerina plaquetaria (Hayward, 2004).

También el Fb está concentrado en los gránulos α . Los MCs no parecen sintetizar Fb; en su lugar, éste es captado del plasma por un proceso que implica al receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Se sabe que las moléculas de Fb que contienen secuencias alteradas en la cadena γ no son almacenadas en los gránulos

Introducción

α , incluso cuando las moléculas son heterodímeros (por ej. contienen una cadena γ normal y una anormal), la captación requiere la unión simultánea de una molécula de Fb a dos receptores diferentes de $\alpha_{IIb}\beta_3$ a través de la secuencia carboxiterminal de la cadena γ . El factor de vWF se encuentra, asimismo, almacenado en los gránulos α de plaquetas. Su contribución al proceso hemostático se demostró debido a que en ciertos estados patológicos se correlaciona mejor con los síntomas de sangrado que el vWF del plasma. El vWF es elaborado en los megacariocitos y en las células endoteliales (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

La Fn, otra proteína plaquetaria, actúa recíprocamente con componentes diversos de la coagulación y de la fibrinólisis. Puede unirse al Col, al Fb, a la fibrina, a la heparina, al factor XIII y a las plaquetas, entre otras, regulando procesos de importancia en la hemostasia como lo son la adhesión y agregación plaquetaria (Lucena, 2007).

Otra proteína en estudio es la Vn, cuyo rol en la trombosis es actualmente polémico. Se han reportado tanto funciones inhibitorias como de promoción de la trombosis. Para estudiar directamente la función de la Vn en fenómenos trombóticos se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*. En ratones con déficit de Vn se presentó predisposición a la trombosis, hallándose pocas plaquetas y contenidos bajos en fibrina, particularmente inestable, alrededor de la lesión, sugiriendo que la Vn tiene como función estabilizar el trombo (Reheman *et al.*, 2005).

La TSP-1 es otra proteína que está depositada en los gránulos α plaquetarios. Aunque algunos fragmentos y péptidos derivados de la TSP-1 estimulan o inhiben la agregación plaquetaria, su función fisiológica en plaquetas no está completamente aclarada hasta el momento. Se ha demostrado recientemente que la TSP-1 endógena es necesaria para la agregación plaquetaria *in vitro* en presencia de niveles fisiológicos de óxido nítrico (NO). El NO exógeno o la elevación de cGMP retrasa la agregación de plaquetas inducida por Tr en condiciones dinámicas y estáticas, y la TSP-1 exógena revierte esta situación. En plaquetas murinas sin TSP-1 se anula la agregación plaquetaria en respuesta a la Tr en presencia de NO exógeno o de 8Br-cGMP. Por lo tanto, la liberación de la TSP-1 de los gránulos α durante la activación plaquetaria proporciona el *feedback* positivo para promover una agregación eficiente, superando la actividad antitrombótica del NO fisiológico (Isenberg *et al.*, 2008).

El factor V es un cofactor esencial de la coagulación que circula en plasma y se almacena en gránulos α formando parte del complejo de MMRN1 a través de un puente disulfuro y aportando aproximadamente el 20% del factor V sanguíneo. El factor V tiene un tamaño variable e incluye

Introducción

formas diméricas. El complejo factor V-MMRN1 es clivado por la Tr para liberar el factor V: este mecanismo, por lo tanto, modularía la entrega del factor V a la plaqueta activada (Hayward *et al.*, 2004).

Se estudió el factor V en cultivos de megacariocitos humanos, detectándose dicho factor y determinándose por microscopía electrónica e inmunofluorescencia que el mismo se incorpora por endocitosis, almacenándose luego en los gránulos α del megacariocito donde generaría el mencionado complejo (Suehiro *et al.*, 2005).

Se sabe que el factor V plasmático de los megacariocitos, adquirido por endocitosis, pasaría a formar parte del factor V del pool plaquetario, debido a que las plaquetas no pueden endocitar el FV. Posteriormente al proceso endocítico, el factor V derivado de plaquetas sería clivado, transformándose en un cofactor parcialmente activo, que presentaría resistencia a la fosforilación catalizada por una quinasa asociada a plaquetas y, por lo tanto, sería menos susceptible a la proteína C activada. Estos datos proporcionan el primer hallazgo *in vivo* de una proteína plasmática endocitada intracelularmente que sufre modificaciones que alteran su función, dando como resultado el secuestro del factor parcialmente activo FVa dentro del compartimiento de las plaquetas, preparado para la acción inmediata de plaquetas activadas en el sitio de injuria (Gould *et al.*, 2005).

También se ha demostrado que la endocitosis del factor V se puede producir a través de un mecanismo dependiente de clatrina, siendo un mecanismo específico, independiente y probablemente mediado por receptores. Por otra parte, en otros estudios, se ha descubierto que los megacariocitos pueden sintetizar factor V (Giampaolo *et al.*, 2005).

El factor XIII, un factor que participa en la fibrinogénesis, está presente en las plaquetas, pero difiere del factor XIII plasmático por tener sólo la subunidad α . El factor XIII plaquetario representa aproximadamente el 50% del factor XIII total en sangre (Hoffbrand's Essential Haematology, 2016).

Otra función importante en plaquetas deriva de la presencia de factores de crecimiento, tales como el *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (PDGF) y el *factor de crecimiento del endotelio vascular* (FCEV). El PDGF es una molécula dimérica unida por puentes disulfuro (PM: 30 kDa) y tiene acción mitogénica en el músculo liso. Puede tener un papel en la proliferación celular normal, así como en el desarrollo de aterosclerosis, en el crecimiento tumoral, en la reparación de heridas y en las respuestas fibroproliferativas (Qiao *et al.*, 2017).

Introducción

El FCEV es una proteína (PM: 45 kDa) que estimula la proliferación de la célula endotelial y la angiogénesis. Se considera que está presente en el citoplasma plaquetario y por lo tanto es una proteína que sería liberada en el momento de la desintegración plaquetaria. La plaqueta contiene concentraciones elevadas de FCEV y puede liberar FCEV después de la estimulación *in vitro* y durante la respuesta hemostática en el momento de sangrado de una herida. Los megacariocitos expresan ARNm de las tres isoformas del FCEV. Las plaquetas también pueden liberar proteínas que afectan a la captación de lipoproteínas oxidadas de baja densidad de los macrófagos, proporcionando otra relación potencial entre la activación plaquetaria y la aterosclerosis (**Tabla 1.I**) (Mancuso & Santagostino, 2017).

Tabla 1.I. Gránulos plaquetarios. Tomada de Mancuso & Santagostino, 2017

| Gránulos | Contenido |
|-------------------------------------|---|
| Gránulos α | <i>Glicoproteínas adhesivas</i> P-selectina, fibrinógeno, vWF, fibronectina, trombospondina, vitronectina <i>Factores de coagulación</i> Factor V, proteína S, factor XI, factor XIII, cininógenos, plasminógeno <i>Factores de crecimiento</i> PDGF, TGF- β , EGF, IGF <i>Factores angiogénicos</i> VEGF, inhibidor de PF4 <i>Inhibidores de la proteasa</i> α 2-antiplasmina, PAI-1, α 2-antitripsina, α 2-macroglobulina, TFPI, inhibidor de C1 <i>Inmunoglobulinas</i> <i>Quimiocinas</i> CXCL7 (proteína básica plaquetaria / NAP-2), CXCL4 (PF4), CXCL1, CXCL5, CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP - 1a), IL1b, IL8, CD40L <i>Proteasas</i> MMP2, MMP9 <i>Proteoglicanos</i> <i>Aminas</i> |
| Gránulos densos | Serotonina, histamina <i>Cationes bivalentes</i> Ca ²⁺ , Mg ²⁺ <i>Nucleótidos</i> ATP, ADP, GTP, GDP <i>Polifosfatos</i> |
| Gránulos de lisosoma | <i>Proteasas ácidas</i> <i>Glicohidrolasas</i> |
| Otros mediadores solubles | CxCL7 (MCP3), HMGB1, tromboxano A2, PAF, sCD40L, defensinas, NO |

ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; EGF, factor de crecimiento epidérmico; GDP, difosfato de guanosina; GTP, guanosina trifosfato; HMGB1, *agrupamiento* de alta movilidad 1; MMP, metaloproteína de matriz; NO, monóxido de nitrógeno; PAF, factor de activación de plaquetas; PAI - 1, inhibidor-1 del activador del plasminógeno; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; TFPI, inhibidor de la vía del factor tisular; TGF- β , factor de crecimiento transformador β ; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; vWF, factor de von Willebrand; CxCL7, marcador del linaje megacariocítico; TxA₂, tromboxano A2; sCD40L, ligando CD40 soluble.

1.2.3.3.2. Gránulos densos (cuerpos densos)

Los gránulos densos reciben este nombre por su natural opacidad en las tinciones con tetróxido de osmio y por su capacidad de ser visibles al microscopio electrónico en preparaciones no teñidas. Se visualizan entre 3 y 8 gránulos densos por plaqueta, con un diámetro aproximado de 20 a 30 nm y presentan un cuerpo central denso rodeado por un halo claro. Se han desarrollado, a fines del siglo XX, dos técnicas citométricas de observación al microscopio electrónico, una basada en la opacidad producida por el contenido de serotonina y la otra usando acetato de uranilo para marcar el contenido de ADP y ATP y visualizar las membranas de los gránulos. Los gránulos densos también pueden observarse por microscopía óptica de fluorescencia o por citometría de flujo utilizando la incorporación de cristales fluorescentes derivados de la quinidina, como la mepacrina (Ambrosio *et al.*, 2012; Tapia Cadena, 2012).

Son organelas de almacenaje de serotonina (un potente vasoconstrictor, que en un 90% de su concentración circulante se encuentra unido a plaquetas), de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{+2} y de un pool no metabólico de ADP y ATP, donde los niveles de adenosina 5'-difosfato (ADP) y la adenosina 5'-trifosfato (ATP) están altamente concentrados en los cuerpos densos (ATP: ADP= 2:3), contrariamente a sus concentraciones relativas en el citoplasma (ATP:ADP = 8:1). 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. 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, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ y GPIb/IX. La liberación del contenido de los gránulos densos 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 (**Tabla 1.I.**) (Mancuso & Santagostino, 2017).

1.2.3.3.3. Lisosomas

Son gránulos pequeños con un diámetro inferior a 300 nm, poseen una estructura homogénea y se encuentran en número reducido. Las plaquetas tienen gránulos lisosomales que contienen las

hidrolasas ácidas típicas de estas organelas. Entre las enzimas que se piensa se originan en estos gránulos se encuentran: β -glucuronidasa, catepsinas, aril sulfatasa, β -hexosaminidasa, β -galactosidasa, endoglucosidasa (heparitinasa), β -glicerofosfatasa, elastasa y colagenasa. La función de las enzimas lisosomales durante la activación plaquetaria está dada por sus interacciones con la pared vascular y por la digestión de los componentes de la matriz subendotelial. Dentro de la plaqueta cumplen una función autofágica eliminando fragmentos citoplasmáticos. Las glicoproteínas de las membranas lisosomales (p.ej. CD63, LAMP-1 y LAMP-3) han sido identificadas, y su presencia en la membrana plasmática sirve como un marcador de la reacción de secreción plaquetaria producida por estímulos fuertes como la Tr (**Tabla 1.I**) (Mancuso & Santagostino, 2017).

1.2.3.3.4. Peroxisomas

Además de los tres tipos de gránulos descritos, mediante técnicas citoquímicas se han observado actividades de peroxidasa y catalasa, lo que posiblemente indica la existencia de pequeños gránulos similares a los peroxisomas descritos en otros tipos celulares. Los peroxisomas son organelas muy pequeñas presentes en las plaquetas. Se considera que contribuyen al metabolismo de los lípidos, especialmente en la síntesis del plasmalógén, y pueden participar en la síntesis del factor de activación plaquetario (PAF). Contienen acil-CoA: dihidroxicetona fosfato aciltransferasa, que cataliza el primer paso en la síntesis de fosfolípidos. (**Tabla 1.I**) (Mancuso & Santagostino, 2017).

1.2.3.4. Citoesqueleto. Proteínas motoras

El citoplasma está organizado espacialmente por una malla de proteínas estructurales llamada en su conjunto citoesqueleto, que está compuesta principalmente por tubulina y polímeros de actina. Cumple una función dual, tanto estática como dinámica. Las plaquetas no estimuladas, circulan en forma discoidea y cambian a esféricas cuando son activadas, lo que permite asegurar una función hemostática correcta. El citoesqueleto está formado por dos estructuras: un conjunto de microtúbulos cercano a la membrana y una malla densa de filamentos de actina. Se sabe que los microtúbulos están compuestos por moléculas de tubulina, que son heterodímeros relacionados a dos polipéptidos globulares, la α y β tubulina, y están asociados con proteínas motoras, tales como quinesina y dineína. La función de los microtúbulos está comprometida con el mantenimiento de la forma discoidea de las

plaquetas en reposo. Durante el cambio de forma, los microtúbulos se contraen y centralizan las organelas de secreción en la cercanía del sistema canalicular. En paralelo, fragmentos de microtúbulos aparecen en la periferia celular formando pseudópodos (Cerecedo *et al.*, 2010).

La malla de actina puede ser subdividida en dos componentes: el esqueleto submembranoso y los filamentos citoplasmáticos. Se encuentran debajo de la membrana plaquetaria o rodeando la banda de microtúbulos. Su función está relacionada con los cambios de forma de la plaqueta, el reordenamiento de complejos de GPs (Ib IX V) y la formación de pseudópodos. La actina es el mayor componente del citoesqueleto y representa el 20% del contenido proteico plaquetario. Se distribuye en dos formas, la primera son monómeros globulares de actina (G-actina) y la segunda está formada por filamentos de actina (F-actina). Varias proteínas, GPs y GPs de trans-membranas [filamina A (ABP-280), talina (Ta), K-actina, miosina I y II] están asociadas a la malla citoplasmática de actina. Estas proteínas tienen como función la estabilización del esqueleto cuando las plaquetas están en reposo y favorecen el entrecruzamiento de las proteínas de membrana con la malla de actina cuando se activan (Dasgupta *et al.*, 2016).

1.2.4. Fisiología y bioquímica plaquetaria

1.2.4.1. Activación plaquetaria

La activación plaquetaria desempeña un papel importante en la hemostasia y la trombosis, y ha sido el blanco de intensivas investigaciones durante muchos años.

Recientemente, Estevez & Du (2017), han descripto cuatro redes de señalización plaquetaria, lo cual provoca que algunos conceptos establecidos desde hace muchos años sean desafiados. Se sabe desde hace mucho tiempo que la activación plaquetaria es inducida por Col o agonistas plaquetarios que se unen a los receptores acoplados a la proteína G, principalmente $\alpha_{Ib}\beta_3$, conduciendo a la activación de la adhesión y agregación plaquetaria. Sin embargo, actualmente se ha descubierto que varios receptores de adhesión plaquetaria, que eran considerados como *pasivos*, son cada vez más importantes en mediar la amplificación de las señales de activación plaquetaria. De manera tal que, varios investigadores han encontrado que un gran número de pares ligando-receptor que participaban en la mediación inmune o inflamatoria, participan en la activación plaquetaria, acoplando de esta manera la respuesta inflamatoria con la trombosis. También se ha demostrado que la vía cGMP-NO jugaría un rol bifásico en la activación plaquetaria y a su vez es importante en la activación inducida

por varias vías de señalización de receptores. Por lo tanto, en base a estos nuevos hallazgos se plantea dividir la activación plaquetaria en 4 fases: 1) Señalización divergente temprana del receptor inducida por agonistas plaquetarios solubles clásicos, así como también por la adhesión de ligandos del receptor y estímulos inflamatorios; 2) convergencia de las vías de señalización tempranas por intermediarios comunes y amplificación de redes de señales; 3) señalización *desde adentro hacia afuera* que conduce a la activación del receptor de adhesión plaquetaria principal, la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que media la adherencia estable de plaquetas y la agregación; y 4) la participación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que amplifica en gran medida la activación plaquetaria y el tamaño del trombo (Estevez & Du, 2017).

1.2.4.1.1. Agonistas plaquetarios y sus receptores

1.2.4.1.1.1. Introducción

Los receptores plaquetarios cumplen un rol fundamental en la formación del coágulo plaquetario. Se ha descrito que el coágulo se produce en tres pasos: iniciación, extensión y perpetuación. La activación de los sitios de unión a ligandos en la $\alpha_{IIb}\beta_3$ es producida por distintos mecanismos de señalización que se inician por la unión de agonistas a las proteínas G constituidas por siete segmentos transmembrana (STRs). Muchos de estos agonistas provienen del contenido plaquetario: la serotonina, que estimula la plaqueta a través de un receptor de tipo 5-HT-2; el tromboxano A₂ (TxA₂), producto de la metabolización del ácido araquidónico (AA) que se une a un receptor específico de tromboxano (TP-1,-2) y el ADP liberado de los gránulos densos que se une principalmente a dos receptores de tipos P2Y1 y P2Y12 (Jin *et al.*, 2002).

Otros agonistas posibles son hormonas liberadas por otros tejidos, incluyendo la epinefrina, que se une a receptores plaquetarios adrenérgicos de tipo α_2 , y la vasopresina proveniente de la hipófisis. La Tr, agonista plaquetario fuerte, cliva a su receptor STR (Receptor Activador de Proteasas, PAR 1,4) formando un nuevo péptido N-terminal que se unirá a la porción C-terminal de dicho receptor (Coughlin, 2000).

1.2.4.1.1.2. Clasificación

1.2.4.1.1.2.1. Familia de las integrinas

Las integrinas son una familia de GPs de membrana implicadas en interacciones célula-matriz

o célula-célula. Son heterodímeros constituidos por dos subunidades, α y β , siendo el lugar de reconocimiento al ligando, para la mayoría de los receptores, el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD). Este grupo incluye cinco receptores de membrana plaquetaria: GP IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), GP Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$), GP Ic/IIa ($\alpha_5\beta_1$), GP Ic'/IIa ($\alpha_6\beta$) y el receptor de la vitronectina ($\alpha_v\beta$). A continuación, describiremos cada uno de ellos detalladamente.

1.2.4.1.1.2.1.1. GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

El complejo GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) es el principal receptor en la agregación plaquetaria, su principal función es la de unir Fb y, en condiciones de elevada tensión de cizallamiento, el vWF. Este complejo se encuentra homogéneamente distribuido sobre la superficie y en la membrana del SCCS. Estudios realizados por inmunomarcación han demostrado la presencia de depósitos internos ubicados en la membrana externa de los gránulos α que representan una cantidad mayor al 30% de $\alpha_{IIb}\beta_3$. Se ha demostrado que la función más importante de este *pool* interno es la incorporación y almacenamiento del Fb plasmático en los gránulos α (Ma *et al.*, 2006).

El complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ es la integrina más abundante y se encuentra en forma de heterodímeros, dependientes de calcio. Su función principal es la de receptor para el Fb, mediando la agregación plaquetaria. Las plaquetas normales contienen alrededor de 50.000 complejos $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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. El complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ actúa como receptor para otras proteínas adhesivas, además del Fb, tales como la Fn, el vWF y la Vn. 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. Por lo tanto, luego de 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 (Coller *et al.*, 2015).

El reconocimiento de los ligandos por el heterodímero implica la secuencia RGD y requiere Ca^{2+} y Mg^{2+} . La unión al Fb 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

Introducción

tirosinas, intercambio de Na^+/H^+ , aglomeración de proteínas del citoesqueleto y entrada de calcio a través de la membrana. Por lo tanto, se ha hallado que la $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ presenta una señalización bidireccional, sucediendo en primer lugar la señalización que proviene de la unión de la integrina con el ligando extracelular, desencadenando la señalización hacia adentro de la célula, denominada en inglés: *outside-in*, teniendo como primer consecuencia importante, la activación de las proteínas quinasas c-Src y c-Src mediada por la inhibición de la pequeña guanosa trifosfatasa (GTPasa) Rho A (Flevaris *et al.*, 2007).

La escisión subsiguiente del sitio de unión de c-Src en β_3 por la calpaina, permite la activación de Rho A que estimula la retracción celular, permitiendo la retracción del coágulo, uniendo la red de fibrina extracelular al aparato contráctil intracelular (Flevaris *et al.*, 2007; Flevaris *et al.*, 2009).

Por lo tanto, la presencia de $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ es imprescindible para que haya agregación plaquetaria y hemostasia normal. Este hecho se evidencia en la enfermedad hemorrágica congénita designada por trombastenia de Glanzmann determinada por la falta de este complejo funcional (Poon *et al.*, 2016).

Por otro lado, se sabe que la *molécula de adhesión endotelio-plaqueta* (PECAM-1) y el CD9 son componentes del plasma, de las membranas del SCA y en menor proporción de la superficie de los gránulos α . Se sabe que el CD9 está formado por una proteína relacionada con el complejo $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ en los procesos de activación, actúa como receptor para Fn y podría estar comprometida en la funcionalidad del receptor para factores de crecimiento. Por otro lado, el PECAM-1 es una molécula de adhesión asociada con el citoesqueleto de las plaquetas activadas y también se expresa en las células endoteliales. Su acción se basa en la inhibición de la respuesta plaquetaria a la Tr y al vWF mediante la regulación de la internalización de la glicoproteína Ib, vía Akt/glucógeno sintasa quinasa-3/dinamina e integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. (**Fig. 1.20**) (Monteiro *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2014).

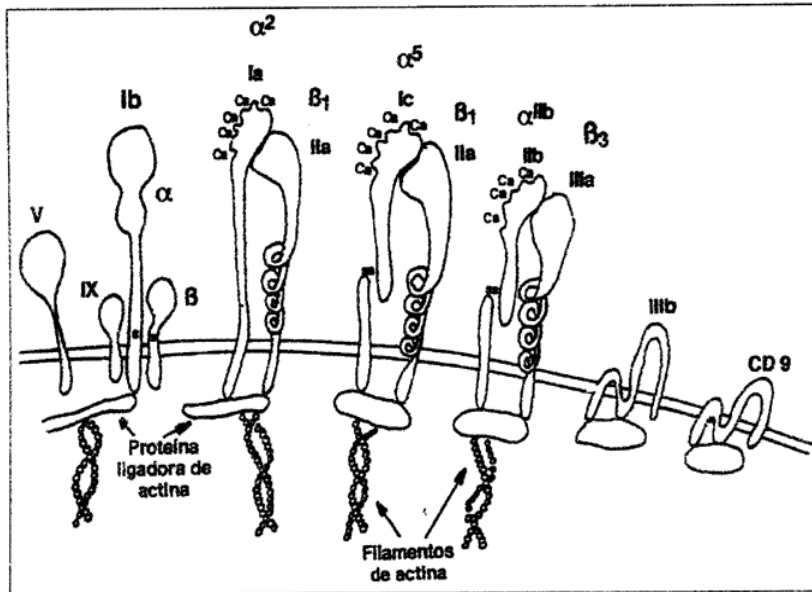


Figura 1.20. Esquema de la estructura de las principales glicoproteínas y receptores de la membrana plaquetaria. Se muestran las subunidades que forman las glicoproteínas: GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), GP Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$), GP Ic/IIa ($\alpha_5\beta_1$), GP Ic'/IIa ($\alpha_6\beta$) y el receptor de la vitronectina ($\alpha_v\beta$). Tomado de Monteiro *et al.*, 2001.

1.2.4.1.1.2.1.2. GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$)

El complejo GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) es el receptor para el Col, 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 MEC, y también está implicado en la agregación de las plaquetas inducida por el Col. La unión al Col depende de Mg^{2+} y Mn^{2+} . Los nuevos inhibidores de la integrina $\alpha_2\beta_1$ revelan que la unión de la integrina al Col bajo condiciones de esfuerzo cortante no requiere la preactivación del receptor (Nissinen *et al.*, 2012).

Otra forma del complejo $\alpha_2\beta_1$ está presente sobre la superficie en muy baja concentración (aproximadamente 100 copias por plaqueta) y una proteínas adhesivas tales como Fb, Fn y vWF (**Fig. 1.20**) (Monteiro *et al.*, 2001).

1.2.4.1.1.2.1.3. GPIc/IIa, GPIc'/IIa y el receptor de vitronectina (Vn)

GPIc/IIa, GPIc'/IIa y el receptor de Vn, corresponden a las integrinas minoritarias de la membrana plaquetaria $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$. El $\alpha_5\beta_1$ es el receptor de Fn; el $\alpha_6\beta_1$ es el receptor de Vn, vWF, Fn, Fb, TSP y el $\alpha_v\beta_3$ es el receptor de laminina (**Fig. 1.20**) (Monteiro *et al.*, 2001; Wachowicz *et al.*, 2016).

1.2.4.1.1.2.2. Glicoproteínas ricas en leucina

Pertenecen a esta familia 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 GPIb/IX/V de la membrana plaquetaria.

GPIb/IX/V. Se sabe que *el receptor de adhesión* formado por un complejo de tres glicoproteínas (GPIb, GPIX y GPV) es el receptor de unión de la superficie plaquetaria al subendotelio, interactuando principalmente con el Col, mediante el vWF y la Tr.

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). Se sabe que 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. La conexión del complejo con la malla de actina se produce a través de una proteína de unión a actina (ABP) y es particularmente importante en la modulación del mecanismo de adhesión. Actualmente se ha descubierto que la actividad de Syk es indispensable para la señalización plaquetaria GPIb/IX/V (Badolia *et al.*, 2017).

El complejo GPIb/IX/V es considerado el más importante de los receptores implicados en la translocación del citoesqueleto dependiente de la activación de moléculas de señalización, produciendo la adhesión y agregación plaquetaria. La inmunomarcación de los tres componentes de este complejo indica su presencia sobre toda la superficie de las plaquetas en reposo, ocasionalmente en el SCA y existe entre un 5 a 10% del total de marcación inmunocolocalizado con el vWF en las membranas granulares; a su vez, se ha dilucidado la estructura cristalográfica y aminoacídica del complejo y sus ligandos (Huizinga *et al.*, 2002; Munday *et al.*, 2010) (**Fig. 1.21**).

Introducción

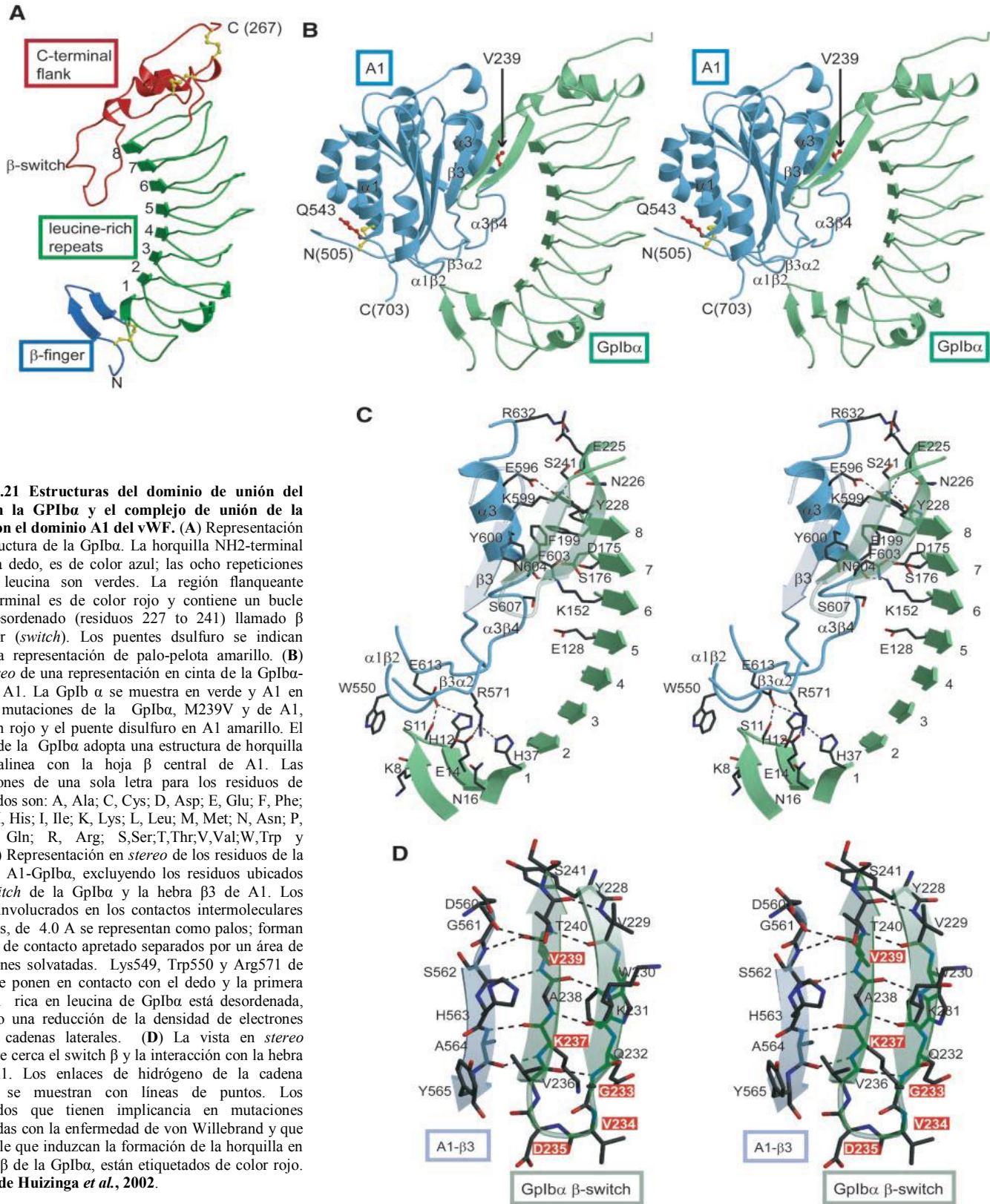


Figura 1.21 Estructuras del dominio de unión del vWF con la GPIIb y el complejo de unión de la GPIIb con el dominio A1 del vWF. (A) Representación de la estructura de la GpIb. La horquilla NH₂-terminal β llamada dedo, es de color azul; las ocho repeticiones ricas en leucina son verdes. La región flanqueante COOH-terminal es de color rojo y contiene un bucle (*loop*) desordenado (residuos 227 to 241) llamado β interruptor (*switch*). Los puentes disulfuro se indican como una representación de palo-pelota amarillo. **(B)** Vista *stereo* de una representación en cinta de la GpIb-complejo A1. La GpIb α se muestra en verde y A1 en azul, las mutaciones de la GpIb, M239V y de A1, R543Q en rojo y el puente disulfuro en A1 amarillo. El *switch* β de la GpIb adopta una estructura de horquilla que se alinea con la hoja β central de A1. Las abreviaciones de una sola letra para los residuos de aminoácidos son: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp y Y, Tyr. **(C)** Representación en *stereo* de los residuos de la interfase A1-GpIb, excluyendo los residuos ubicados en el *switch* de la GpIb y la hebra β 3 de A1. Los residuos involucrados en los contactos intermoleculares mas cortos, de 4.0 Å se representan como palos; forman dos sitios de contacto apretado separados por un área de interacciones solvatadas. Lys549, Trp550 y Arg571 de A1 que se ponen en contacto con el dedo y la primera repetición rica en leucina de GpIb está desordenada, mostrando una reducción de la densidad de electrones para sus cadenas laterales. **(D)** La vista en *stereo* muestra de cerca el *switch* β y la interacción con la hebra β 3 de A1. Los enlaces de hidrógeno de la cadena principal se muestran con líneas de puntos. Los aminoácidos que tienen implicancia en mutaciones relacionadas con la enfermedad de von Willebrand y que es probable que induzcan la formación de la horquilla en el *switch* β de la GpIb, están etiquetados de color rojo. Tomado de Huizinga *et al.*, 2002.

Introducción

Cuando el receptor GPIb/IX/V funciona unido a la Tr, participa en la propagación de la respuesta a este importante agonista en la activación y agregación plaquetaria. Se estima que el número de moléculas de este complejo se aproxima a 25.000/plaqueta, siendo la segunda glicoproteína más abundante de la MP. La GPIb es la principal sialoglicoproteína de la MP y, como tal, es responsable en gran medida de la carga negativa de las plaquetas y de su comportamiento electroforético. 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 y su exposición en la superficie disminuye. 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 GPIb β puede ser, en parte, responsable del mantenimiento de la plaqueta en estado de reposo. 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 (Rivera *et al.*, 2000).

1.2.4.1.1.2.3. Otros receptores

La GPIV (CD36) es una glicoproteína mayoritaria de la MP y funciona como receptor de Col II y de TPS, participando en la transducción de señales. Existen alrededor de 23.000 moléculas de GPIV por plaqueta, encontrándose la mayor parte de éstas en la MP de la plaqueta en reposo. Se sabe que se encuentra también en la membrana de los gránulos α y que aumenta su expresión en la superficie después de la estimulación plaquetaria con Tr. Por microscopía electrónica se ha detectado GPIV sobre la superficie plaquetaria, en el SCA y en la membrana de los gránulos α . La GPIV está involucrada en las propiedades de adhesión y agregación plaquetaria. Actualmente se ha ampliado el panel de receptores plaquetarios, y se han estudiado sus funciones (Mancuso & Santagostino, 2017) (**Tabla 1.II**).

Introducción

Tabla 1.II. Principales receptores plaquetarios y sus funciones. Tomado de Mancuso & Santagostino, 2017

| Receptores | Funciones |
|---|---|
| <i>Receptores tipo Toll:</i> TLR1-4, TLR6-7, TLR9 | Involucrados en la inmunidad innata, son receptores de patógenos y unen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos. TLR4 se une al lipopolisacárido bacteriano, iniciando la defensa antimicrobiana del huésped y activa neutrófilos, induciendo la formación de NET; TLR2 se requiere en la formación de agregados de plaqueta-neutrófilo que mejoran la fagocitosis de patógenos; la estimulación de TLR7 media la formación de grandes agregados de plaqueta-neutrófilo; TLR9 reconoce los motivos de ADN no metilado (motivos CpG) encontrados en bacterias, parásitos y virus. |
| <i>Receptores del complemento:</i> C1q, C3aR, C5aR1 | Baja expresión en las plaquetas en reposo, aumento de la expresión luego de la activación plaquetaria. Unión de anafilatoxinas C3a y C5a, aumento de la permeabilidad vascular y promoción de quimiotaxis. Regulación positiva tras la activación. |
| <i>Receptores de quimioquinas:</i> CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4 | Unión a quimiocinas. |
| <i>Receptores para inmunoglobulina:</i> FcγRIIa (CD32a) | Se une a complejos inmunitarios de componentes bacterianos o virales y células o patógenos que opsonizaron Ig, induciendo activación plaquetaria, secreción y agregación. Tiene baja afinidad por las moléculas monoméricas individuales de IgG y alta avidéz para los inmunocomplejos que contienen IgG. |
| <i>Moléculas de adhesión:</i> P-selectina (CD62P) | Movilizada rápidamente desde los gránulos α hasta la superficie plaquetaria, media la adhesión a las células que expresan PSGL1, tales como leucocitos, células endoteliales y otras plaquetas. |
| <i>Integrinas</i> (α5β1 o VLA5; α6β1 o VLA6; α2β1 o VLA2 o GPIa/IIa o CD49b; αIIbβ3 o GPIIb/IIIa) | Proteínas transmembrana heterodiméricas que median interacciones con proteínas de la matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno, y moléculas de adhesión sobre otras células, tales como ICAMs y JAMs sobre leucocitos y endotelio. GPIIb/IIIa se une a Mac-1 (CD11b/CD18) en leucocitos a través de puentes de fibrinógeno. |
| <i>Superfamilia Ig:</i> moléculas de adhesión celular ICAM-2, JAM-A/C, PECAM-1 | Ligandos para integrinas y moléculas de adhesión en otras células. |
| <i>Complejo de glicoproteína Ib-IX-V</i> | Media el contacto inicial de las plaquetas con el subendotelio expuesto mediante unión a vWF. |
| <i>Glicoproteína VI</i> | Media la unión de las plaquetas al colágeno. |
| CD40L | Aumenta la expresión de E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 y la secreción de quimiocinas por células endoteliales. Estimula la diferenciación de células B y el cambio de clases de anticuerpos. |
| <i>Receptores activados por proteasa:</i> PAR1 y PAR4 | Activados por la unión de Tr, desencadenan la señalización intracelular a través de proteínas heterotriméricas G. |
| <i>Receptores de ADP:</i> P2Y1 y P2Y12 | Activado por la unión de ADP, desencadena la señalización intracelular a través de proteínas G. |
| <i>El receptor de tromboxano</i> A2 (TP) | Une el tromboxano A2 que induce activación plaquetaria. |
| <i>Siglec-7</i> | Su compromiso por su ligando específico GD2 gangliósido conduce a la apoptosis plaquetaria evitando las excesivas respuestas inmunes e inflamatorias. |
| <i>MHC de clase I</i> | Induce efecto inmunosupresor sobre las células T CD8 + |

ICAM, molécula de adhesión intercelular; Ig, inmunoglobulina; JAM, molécula de adhesión funcional; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; NETs, trampas extracelulares de neutrófilos; PECAM, molécula de adhesión endotelio-plaqueta; VLA, antígeno muy tardío; vWF, factor de von Willebrand.

Introducción

Los mediadores liberados de los gránulos plaquetarios, especialmente las proteínas adhesivas, factores de crecimiento, quimiocinas importantes en la hemostasia, pueden estar implicadas junto con las MPs en la progresión del proceso inflamatorio y facilita la participación de las plaquetas en las enfermedades inflamatorias crónicas agudas (Morrell *et al.*, 2014).

Además, la expresión de diversos y numerosos receptores de membrana (**Tabla 1.III**), tanto constitutiva como dependiente de la activación (P-selectina, PSGL-1, CD40, el complejo GPIb/IX/V y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) intervienen en la adhesión y agregación de las plaquetas, no sólo en la hemostasia y la trombosis, sino también en la inflamación (Wachowicz *et. al.*, 2016).

Tabla 1.III. Glicoproteínas de la superficie plaquetaria (GPs) y sus agonistas. **Tomado de Wachowicz *et. al.*, 2016.** Fibrinógeno, Fb; Factor de von Willebrand, vWF; Fibronectina, Fn; Vitronectina, Vn; Trombina, Tr; Colágeno, Col; Trombospondina, TSP.

| Clásicos | CD | Principales glicoproteínas de la superficie plaquetaria (GP's). Receptores | |
|--------------|------------|--|------------------------------|
| | | INTEGRINAS | LIGANDOS |
| GP IIb/IIIa | CD41b | $\alpha_{IIb}\beta_3$ | Fb, vWF, Fn, Vn |
| GP Ib-IX | CD42 a,b,c | | vWF, Tr |
| GP Ia-IIa | CD49b | $\alpha_2\beta_3$ | Col |
| GP Ic-IIa | CD49e | $\alpha_5\beta_1$ | Fn |
| GP Ic'-IIa | CD49f | $\alpha_6\beta_1$ | Vn, vWF, Fn, Fb, TSP |
| Vitronectina | CD31 | $\alpha_v\beta_3$ | Laminina |
| PECAM-1 | CD31 | α | Interacción con el endotelio |
| P-selectina | CD62P | α | Interacción con leucocitos |

La Tr y el PAF generados en el sitio inflamatorio estimulan la secreción plaquetaria en cuestión de min a seg *in vitro*. Además, las plaquetas pueden liberar muchos factores después de la agregación intercelular heterotípica o la adherencia a leucocitos. Las moléculas de señalización inflamatorias más potentes secretadas por plaquetas son las quimiocinas (**Tabla 1.IV**): el endotelio inflamado se une a RANTES (CCL5), CXCL5, CCL3 y PF4 (CXCL4) (Wachowicz *et. al.*, 2016).

Introducción

Tabla 1.IV. Quimiocinas plaquetarias y sus receptores. Tomado de Wachowicz *et. al.*, 2016.

| Quimiocinas plaquetarias | Nombre común | Receptor(s) | Receptores quimiocina plaquetarios |
|--------------------------|----------------|----------------|---|
| CXPetri dishesCL1 | GRO- α | CXCR2>CXCR1 | CCR1 |
| CXCL4 | PF4 | CXCR3B, GAG | CCR3 |
| CXCL4L1 | PF4alt | desconocido | CCR4 |
| CXCL5 | ENA-78 | CXCR2 | CXCR4 |
| CXCL7 | NAP-2 | CXCR2>CXCR1 | CX3CR1 |
| CXCL8 | IL-8 | CXCR1, CXCR2 | Las que son controvertidas no se muestran |
| CXCL12 | SDF-1 α | CXCR4 | |
| CCL2 | MCP-1 | CCR2 | |
| CCL3 | MIP-1 | CCR1, 2, 3 | |
| CCL5 | RANTES | CCR1, 2, 3,4,5 | |
| CCL17 | TARC | CCR4, CCR8 | |

La P-selectina translocada de los gránulos α a la membrana de la superficie de las plaquetas durante la activación interactúa con células endoteliales, monocitos, neutrófilos y linfocitos, a través de PSGL-1 (P-selectina glicoproteína-1) que se expresa en las células inmunes (Thomas & Storey, 2015). Por otro lado, las plaquetas ejercen influencia sobre la inflamación por la liberación de factores pro-inflamatorios e inmunomoduladores. Una amplia gama de quimiocinas incluyendo CXCL1, CXCL4, CXCL5 (ENA-78, proteína activadora de neutrófilos epiteliales 78), CXCL7 (PBP, B - TG, CTAP - III, NAP - 2), CXCL8 (IL - 8), CXCL12, CCL2, CCL3 (MIP-1/ α , proteína inflamatoria de macrófago-1 α), CCL5 (RANTES) (Tabla 1.IV), se almacenan en los gránulos α plaquetarios. Entre estas quimiocinas, CXCL4 y CXCL7 son las más abundantes. La quimiocina plaquetaria CXCL7 se puede escindir para generar cuatro quimiocinas distintas tales como la proteína básica plaquetaria (PBP), CTAP-III, β -tromboglobulina y NAP-2 con actividad quimiotáctica. Los gránulos α plaquetarios contienen diferentes proteínas proangiogénicas y antiangiogénicas (angiopoyetina, CXCL12 y MMPs (MMP-1, -2, y 9). Hay numerosos factores de crecimiento tales como PDGF, FGF, VEGF, EGF, HGF e IGF que son liberados de los gránulos α . A su vez, las plaquetas son la principal fuente de CD40L (CD154). La CD40L es una glicoproteína de membrana de tipo II de la familia de TNF encontrados en células T, células B y plaquetas. La forma soluble (sCD40L) se libera de las plaquetas activadas, liberan aproximadamente el 95% de todos los sCD40L encontrados en plasma (Wachowicz *et. al.*, 2016).

Por ejemplo, se ha encontrado un aumento del número de plaquetas activadas en el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH), por lo que se propone que la disminución de plaquetas predeciría las lesiones cerebrales y el mayor riesgo a desarrollar desórdenes neurocognitivos asociados

al VIH (HAND), lo que sugiere que el aumento del consumo puede ser la consecuencia de la activación plaquetaria aberrante durante la infección. Consistentemente con esto, fue demostrado previamente un aumento de sCD40L tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo (LCR) de infectados por el VIH con deterioro cognitivo, comparado con las personas infectadas por el VIH, no afectadas cognitivamente. A su vez, se ha demostrado actualmente en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BBB) que al tratar el endotelio microvascular (BMVECs) con sCD40L se produce una regulación positiva de la adhesión de moléculas, que conduciría a un aumento en la adhesión de monocitos a estas células. Por lo tanto, se comprueba la hipótesis de que la acumulación de sCD40L en los pacientes con HAND podría estar contribuyendo a la permeabilidad aumentada de BBB, proporcionando así a los leucocitos pro-inflamatorios una puerta de entrada hacia el SNC. Consistentemente con este hallazgo, se cree que una mayor infiltración de los leucocitos activados al SNC sería uno de los mayores factores de riesgo que contribuyen a la progresión de HAND, debido al desarrollo de un proceso pro-inflamatorio, progresivamente neurotóxico. En consecuencia, se puede concluir que el exceso de SCD40L contribuye a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y se cree que regula la permeabilidad en los trastornos inflamatorios del SNC (Wachowicz *et. al.*, 2016).

1.2.4.1.2. Mecanismos de activación: vías de transducción de señales

En la circulación, las plaquetas se mantienen en estado de reposo por el NO y la prostaciclina (prostaglandina I₂, PGI₂), que son liberados por el endotelio vascular, los cuales aumentan los niveles de cGMP y cAMP, suprimiendo la actividad plaquetaria mediante la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa G (PKG). Después de la lesión del vaso, los componentes de la matriz subendotelial quedan expuestos, incluyendo el Col, que proporciona una superficie adhesiva para que las plaquetas se adhieran e inicien los eventos de señalización y activación plaquetaria. La producción local de Tr y la secreción de mediadores secundarios también contribuyen a la iniciación de la activación plaquetaria. Se activan componentes clave de las vías de señalización de plaquetas, incluyendo fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa C (PKC) y fosfatidilinositida-3-quinasa (PI₃K), apoyando la activación plaquetaria sostenida y la formación de trombos a través de la iniciación de reordenamientos del citoesqueleto, secreción de gránulos y activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Bye *et. al.*, 2016).

Introducción

Para limitar el crecimiento y prevenir la formación de trombos, actualmente se ha comprobado que las plaquetas contienen mecanismos autorreguladores de retroalimentación negativa que contrarrestan la señalización positiva. Estos reguladores negativos incluyen el motivo inhibitorio dentro del inmunorreceptor de tirosina (ITIM), la molécula de adhesión selectiva de células endoteliales (ESAM), que regula negativamente la actividad de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, las fosfatasas que contrarrestan la señalización positiva dependiente de la fosforilación y la desensibilización del receptor, que reduce la respuesta de las plaquetas a la señalización mediadora secundaria por el tromboxano A₂ (TxA₂) (Coxon *et al.*, 2017; Bye *et al.*, 2016) (**Fig.1.22**).

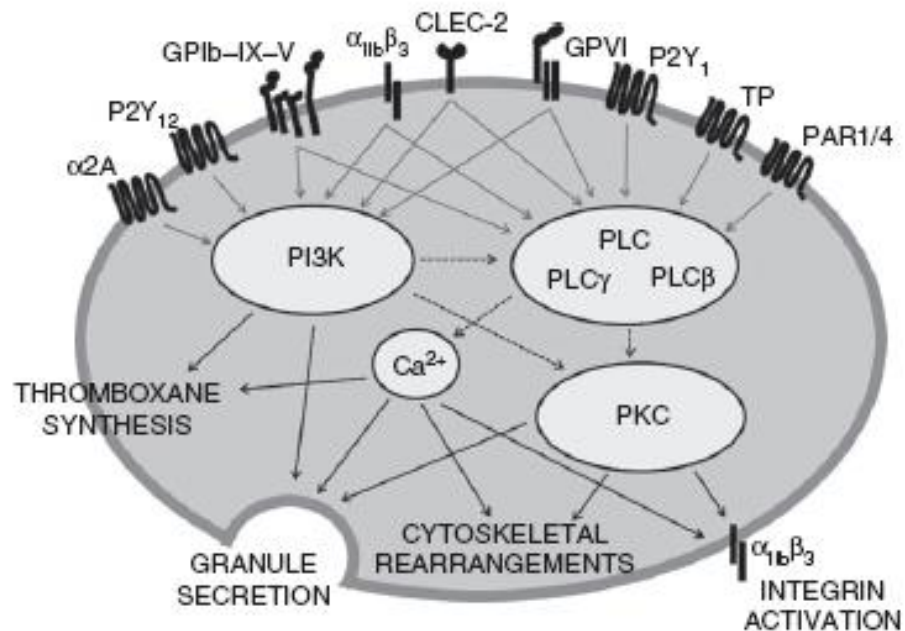


Figura 1.22. Mediadores de la activación plaquetaria. El CLEC-2, receptor de lectina de tipo C2; GPVI, glicoproteína VI (receptor del colágeno); GPIb-IX-V, glicoproteína Ib-IX-V (receptor del factor de von Willebrand); PAR, receptor activado por proteasa; receptores P2Y1/P2Y12, ADP; TP, receptor de tromboxano A₂; $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptor para Fb; α_2A , receptor adrenérgico. **Tomado de Bye *et al.*, 2016.**

La fosfolipasa C (PLC), la proteína quinasa C (PKC) y la fosfatidilinositida-3-quinasa (PI₃K) son mediadores clave de la activación plaquetaria. Estos nodos de señalización subyacen a varios procesos claves necesarios para la activación plaquetaria, incluyendo secreción de mediadores secundarios y la activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, facilitando la fijación de Fb y la agregación plaquetaria, además del reordenamiento del citoesqueleto, que permite el cambio de forma de las

Introducción

plaquetas y la extensión (**Fig. 1.22 y 1.23**) (Bye *et. al.*, 2016).

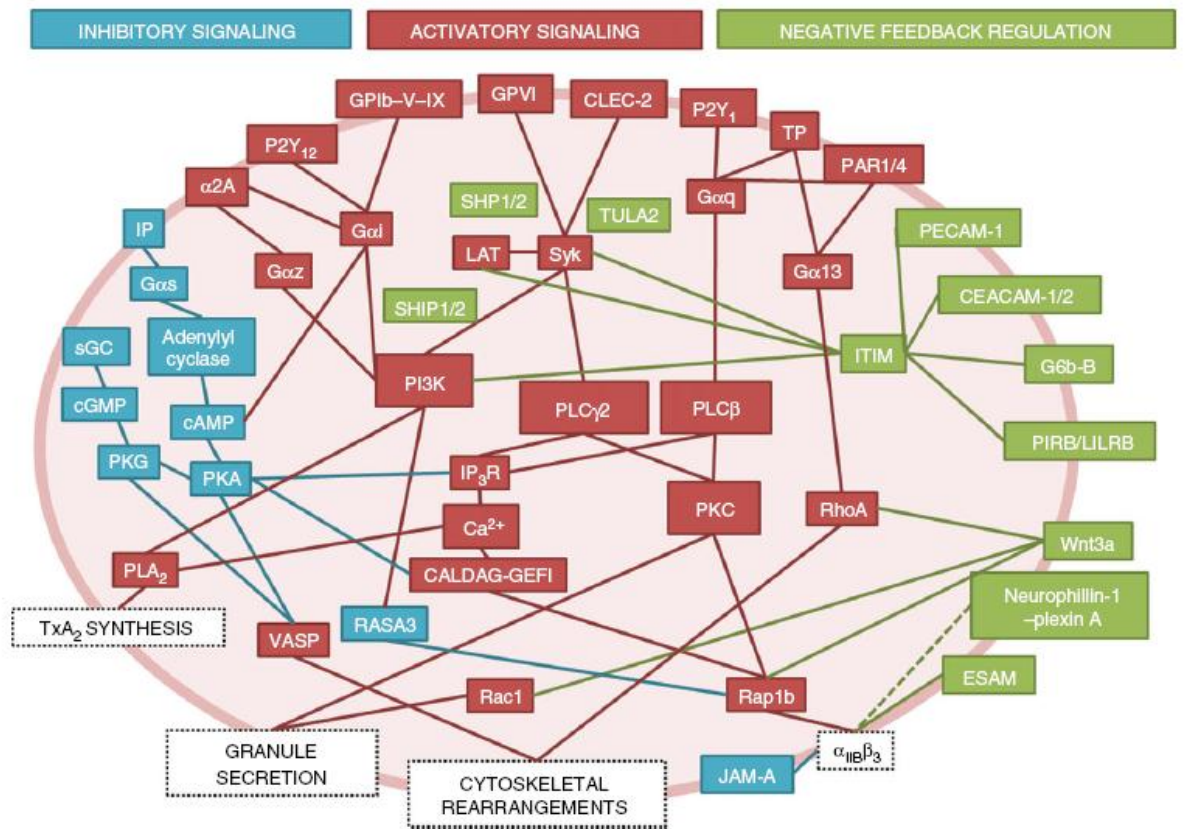


Figura 1.23. Señalización plaquetaria. CALDAG-GEFI, factor de intercambio Rap1 guanina nucleótido dependiente de Ca^{2+} ; CEACAM-1/2, molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario-1/2; CLEC-2, receptor de lectina de tipo C-2; ESAM, molécula de adhesión selectiva de células endoteliales; GP, glicoproteína; IP, receptor de prostaglandina; IP₃R, receptor de inositol trifosfato; ITIM, motivo inhibitorio dentro del inmunorreceptor de tirosina; JAM-A, molécula de adhesión funcional A; LAT, enlazador de células T activadas; PAR, receptor activado por proteasa; PECAM-1, molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias-1; PIRB, receptor B similar a inmunoglobulina; PKA, proteína quinasa A; PKG, proteína quinasa G; PLA₂, fosfolipasa A₂; SGC, guanil ciclasa soluble; TULA2, ligando-2 ubiquitina de células T; TxA_2 , tromboxano A₂; VASP, fosfoproteína estimulada por vasodilatadores; α_2A , receptor adrenérgico. **Tomado de Bye *et. al.*, 2016.**

Los modelos de señalización plaquetaria describen con frecuencia rutas de señalización activadas por agonistas individuales; sin embargo, la señalización de plaquetas *in vivo* es altamente compleja e implica la activación simultánea por múltiples agonistas y reguladores negativos, que forman una compleja red de señalización. Por lo tanto, varias moléculas de señalización clave, mencionadas previamente, tales como PLC, PKC y PI₃K, son comunes entre las diferentes vías y nodos clave de la regulación plaquetaria (Bye *et. al.*, 2016).

En la **Fig 1.23** se esquematizan las vías de señalización plaquetaria actualizadas, detallando el lugar de acción de los mediadores de inhibición, activación y de retroalimentación negativa descubiertos hasta el momento. Los cuadros y líneas azules representan los mediadores de señalización inhibitoria que actúan para suprimir la función plaquetaria en ausencia de activadores plaquetarios en el endotelio sano; los cuadros y líneas rojas representan mediadores de señalización activadora después de la activación plaquetaria por agonistas plaquetarios y finalmente los cuadros y líneas verdes representan los mediadores de retroalimentación negativa y señalización inhibitoria que actúan para limitar la activación plaquetaria tras la estimulación por agonistas plaquetarios (Bye *et. al.*, 2016).

Debido a estos hallazgos, actualmente se ha dividido a las vías de señalización plaquetaria de manera tal que puedan interpretarse mejor los diferentes mecanismos de traducción de señales, como se detalla a continuación.

1.2.4.1.2.1. Señalización de la activación plaquetaria mediada por los receptores de adhesión

1.2.4.1.2.1.1. Señalización a través de la GPIb-IX

La adhesión inicial de las plaquetas a la pared de los vasos sanguíneos bajo altas velocidades de cizallamiento de flujo se produce mediante la interacción entre el vWF inmovilizado en la superficie del endotelio o en la matriz subendotelial con su receptor de plaquetas, el complejo GPIb-IX-V. La subunidad de unión a ligando de GPIb-IX-V, la GPIb/ β , contiene sitios de unión para el dominio $\alpha 1$ de vWF en su dominio NH₂-terminal. Por otro lado, se sabe que el vWF y GPIb responden a la creciente fuerza de cizallamiento mediante los cambios conformacionales que aumentan su afinidad entre sí, formando *enlaces flexibles* que permiten la adherencia de las plaquetas bajo el esfuerzo cortante (Kim *et al.*, 2010).

El dominio citoplasmático de GPIb α se une a los filamentos de actina, que subyacen en la membrana plasmática plaquetaria, a través de la interacción con filamina A. Esta interacción es crítica para el mantenimiento de la estructura de la membrana y la forma plaquetaria, debido a que es un importante refuerzo estructural para resistir la fuerza de cizallamiento durante la adhesión plaquetaria (Cranmer *et al.*, 2011).

Introducción

También se ha evidenciado que, a pesar de su capacidad para resistir la unión, la GPIb-IX media la adhesión plaquetaria al vWF de forma transitoria. La adhesión estable de plaquetas iniciada por el vWF/GPIb-IX requiere la activación de otro receptor de vWF, la integrina α_{IIb}/β_3 . De hecho, cada vez es más evidente que la unión entre el vWF y la GPIb-IX bajo la fuerza de cizallamiento, desencadena las señales de activación plaquetaria, activando la integrina α_{IIb}/β_3 y de esta manera la adhesión plaquetaria estable sería dependiente de la misma (Li *et al.*, 2010).

Recientemente se demostró que el tallo extracelular de la yuxtamembrana de GPIb α , denominado dominio mecanosensible (MSD, Ala417-Phe483), se despliega y extiende cuando está sujeto a la fuerza de tracción dependiente de vWF (Zhang *et al.*, 2015).

Existe otra región en el dominio de repetición rico en leucina (LRRD), que actuaría también mediada por vWF (Ju *et al.*, 2015).

Se ha establecido que los despliegues de LRRD y MSD desempeñan papeles distintos en la transducción dependiente de la unión del factor de vWF, desencadenando la señalización intracelular a través de la elevación de la concentración de los niveles de calcio. La fuerza mecánica acoplada a la señalización requiere la interacción entre el dominio citoplásmico GPIb, y una molécula intracelular de proteína de forma 14-3-3 δ (Ju *et al.*, 2016).

La GPIb-IX se une también a la Tr y es importante para la activación plaquetaria inducida por bajas dosis de Tr. Esta función de GPIb-IX requiere de los sitios de unión de Tr alrededor de tres residuos de tirosina sulfatada (Y276DYY) en el dominio de unión a ligando de GPIb α , que es distinto del sitio de unión a vWF (Zarpellon *et al.*, 2011).

Es importante destacar que, bajo condiciones donde la trombosis es inducida por una lesión vascular limitada (como el modelo de lesión arterial inducida por láser), sólo son detectables bajas concentraciones de Tr, que, sin embargo, son críticas para la formación de trombos plaquetarios *in vivo*. Por lo tanto, la señalización de la GPIb-IX inducida por el vWF o por la Tr, requiere de la unión de 14-3-3 δ al dominio citoplasmático de GPIb α , una quinasa de la familia Src (SFK) (Lyn y posiblemente Src) – vía de señalización Rac1, y activación de la fosfoinositida 3-quinasa (PI₃K) – vía la proteína quinasa dependiente de cGMP y Akt (PKG), vía proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (ERK1/2 y p38) y vía LIM quinasa 1 (LIMK1) (Estevez *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que otras proteínas como la tirosina quinasa de Bruton (Btk) y la molécula adaptadora (ADAP) son importantes, aunque restaría dilucidar si esto se debe a que juegan papeles en

Introducción

las vías de amplificación, tal como la vía ITAM, o en la señalización a través de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kasirer-Friede *et al.*, 2014).

Es interesante el papel de LIMK1 en la estimulación del vWF y en la activación plaquetaria inducida por bajas dosis de Tr, siendo específica de la ruta de señalización GPIb-IX, porque LIMK1 parece desempeñar un papel negativo en la activación plaquetaria inducida por la GPIb-IX independiente de agonistas plaquetarios. La LIMK1 promueve activación estimulada por vWF por la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2) y la consiguiente producción de TxA_2 (Estevez *et al.*, 2013; Estevez & Du, 2017) (**Fig. 1.24**).

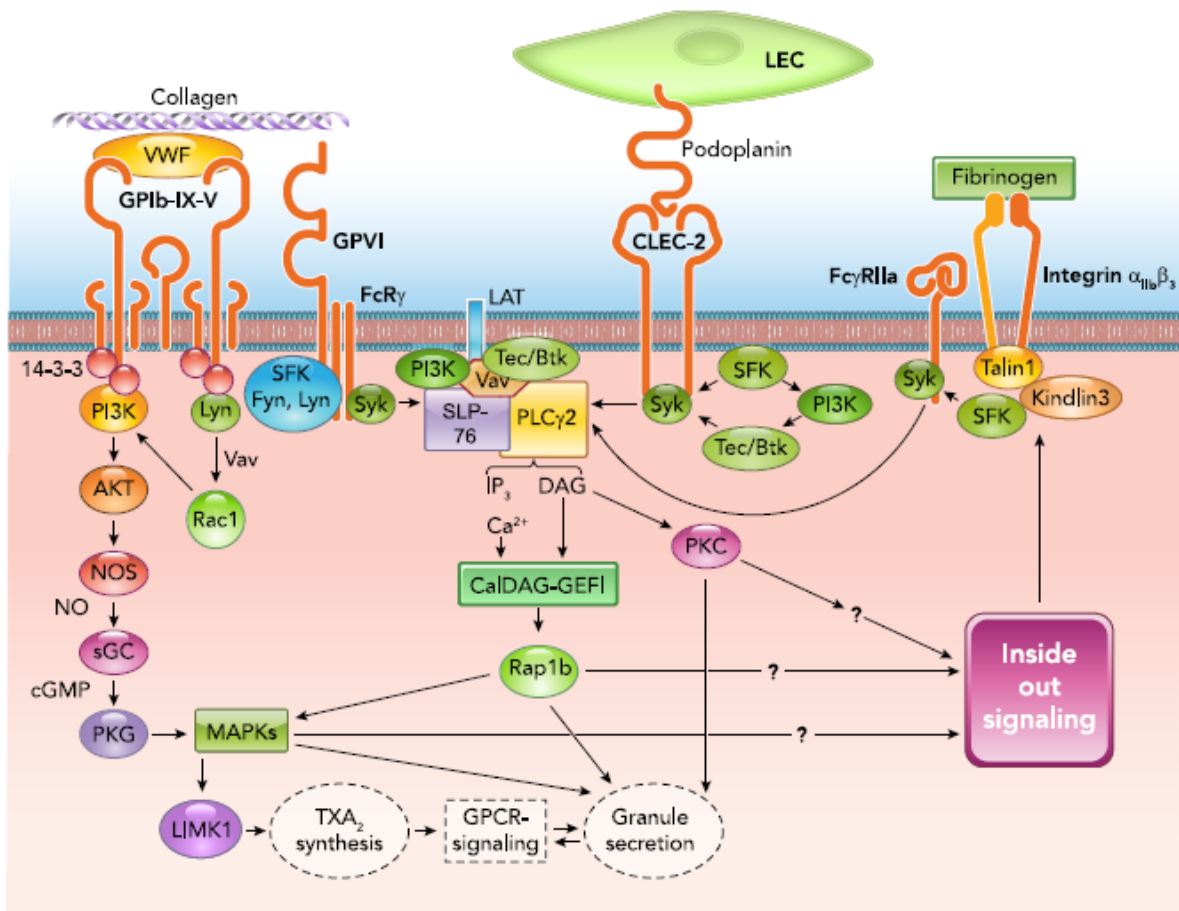


Figura 1.24. Vías de señalización de los principales receptores de plaquetas para ligandos de adhesión que conducen a la activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y las funciones importantes de la vía ITAM. sGC, guanilil ciclase soluble; NOS, NO sintasa; SFK, src kinase familiar; LEC, célula endotelial linfática; SLP-76, SH2 fosfoproteína de leucocitos que contiene dominio de 76 kDa; Btk, tirosina quinasa de Bruton; Rap1b, proteína 1b relacionada con RAS; MAPKs, proteínas quinasas activadas por mitógenos; TxA_2 , tromboxano A_2 . **Tomado de Estevez & Du, 2017.**

1.2.4.1.2.1.2. Señalización a través de ITAM

El inmunorreceptor basado en la activación de tirosina (ITAM) es un motivo de la secuencia proteica que se encuentra en el dominio citoplasmático de ciertos inmunorreceptores que contienen dos residuos de tirosina dentro de una secuencia conservada YxxL/IX6-12YxxL/I (donde x es cualquier aminoácido) y juega un papel importante en la señalización de los receptores de la activación de leucocitos (Arman *et al.*, 2015; Boulaftali *et al.*, 2014).

Los receptores ITAM expresados en plaquetas humanas incluyen la cadena del receptor Fc (FcR/ α), una subunidad de ciertos receptores Fc de Ig de importancia crítica para la transducción de señales, y el receptor Fc/IIa (Fc/RIIa), un receptor Fc de IgG importante para la respuesta en plaquetas humanas frente a los complejos antígeno-anticuerpo y agregados de las IgG (no expresados en plaquetas de ratón) (Worth *et al.*, 2006).

Los receptores ITAM no sólo son críticos en la transducción de señales de inmunorreceptores en plaquetas y leucocitos, sino que también son importantes para la transducción de señales durante la adhesión plaquetaria (Boylan *et al.*, 2008).

Se ha comprobado recientemente que el FcR γ está asociado con GPVI y GPIb-IX y que el Fc/ γ RIIa con GPIb-IX e integrina α_{IIb}/β_3 (Zhi *et al.*, 2013).

Por otro lado, el CLEC2, una podoplanina plaquetaria importante para la adhesión plaquetaria a vasos linfáticos, tiene un solo motivo similar a ITAM-YxxL, conocido como hemITAM (Estevez & Du, 2017).

1.2.4.1.2.1.2.1. GPVI

El papel de ITAM en la señalización de la adhesión plaquetaria se comprende mejor por su acción en el receptor de Col, GPVI, desempeñando un papel crítico en la activación plaquetaria inducida por el Col. La GPVI forma un complejo no covalente con FcR γ y se asocia supuestamente con ciertos SFK, tales como Lyn y Fyn, a través de su dominio rico en prolina intracelular. Este complejo es necesario para transmitir señales inducidas por unión de Col a los dominios unidos a inmunoglobulina extracelular de GPVI (Berlanga *et al.*, 2002).

Se sabe que luego de la agrupación de GPVI inducida por Col, ITAM es asociado con el FcR γ , una tirosina fosforilada por SFK. Sin embargo, el papel de Lyn en GPVI sigue siendo controvertido; algunos estudios sugieren que Lyn desempeña un papel regulador negativo en la señalización de ITAM

mediada por GPVI, y probablemente su papel se desarrollaría por la vía de regulación del inmunoreceptor tirosina basado en la inhibición (ITIM), tales como los que son mediados por la vía PECAM-1 y de forma similar a la inmunoglobulina que se une al receptor B, y que contrarresta la señalización por ITAM (Ming *et al.*, 2011).

La fosforilación de la tirosina de ITAM permite la unión de la tirosina quinasa Syk a través de sus dominios doble homólogos de Src (SH2), permitiendo su activación. Curiosamente, la producción de especies reactivas de oxígeno dependientes de NOX han demostrado estimular a la GPVI induciendo la activación de Syk, posiblemente por la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa (Delaney *et al.*, 2016).

A su vez, Syk activado inicia una cascada de eventos, involucrando moléculas adaptadoras y quinasas: leucocitos que contienen dominio SH2 de fosfoproteína de 76 kDa (SLP-76), el cual sería el enlazador para células T activadas (LAT), Grb2, Gads, quinasas de la familia Tec (Btk y Tec), y PI₃K que conducen a la translocación de la membrana plasmática, la fosforilación y activación de la fosfolipasa C/β₂ (PLC/α₂). La PLC/β₂ hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). El DAG y el IP₃ activan la proteína quinasa C y liberan calcio en el citosol de las reservas intracelulares, promoviendo la producción de tromboxano y la secreción de gránulos, la señalización *de adentro hacia afuera* y la activación de la integrina α_{IIB}/β₃ (Estevez & Du, 2017). (**Fig.1.24**).

1.2.4.1.2.1.2.2. CLEC-2

Se ha descrito el receptor plaquetario para la podoplanina (PDPN), la glicoproteína de transmembrana, denominada CLEC-2. En algunos ensayos de laboratorio, para estimular la señalización de CLEC-2 se ha utilizado una proteína de veneno de serpiente, la rhodocitina (Suzuki-Inoue *et al.*, 2010).

La adhesión plaquetaria mediada por el CLEC-2 expresa PDPN celular (por ejemplo, en células endoteliales linfáticas y pericitos), la cual es importante para el desarrollo y la separación de los vasos linfáticos provenientes de vasos sanguíneos, para mantener la integridad de la unión del vaso sanguíneo al linfático, previniendo el flujo sanguíneo dentro de los linfáticos y posiblemente también para desempeñar un papel en el mantenimiento de la integridad vascular durante la inflamación (Boulaftali *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se ha demostrado que la delección de PDPN o CLEC-2 en ratones produce una mezcla de sangre y linfa (Finney *et al.*, 2012).

Por otro lado, la vía de señalización CLEC-2/PDPN dependiente de hemITAM involucra algunas moléculas similares a las usadas por los receptores ITAM completos y requieren la unión del dominio Syk-SH2 al motivo hemITAM- CLEC-2 fosforilado (Hughes *et al.*, 2015).

Recientemente, se sugiere que la activación de Syk en la señalización de la CLEC-2 involucra PI₃K y la fosforilación Syk mediada por la familia quinasa Tec, mientras que en la señalización mediada por GPVI, PI₃K y la familia de quinasas Tec son activadas por Syk (Manne *et al.*, 2015).

Dicho hallazgo se debería a que los mecanismos de ITAM o el motivo de fosforilación hemITAM podrían ser diferentes. La fosforilación hemITAM-CLEC-2 requeriría tanto de Syk como de SFK. En contraste, el motivo de fosforilación ITAM-GPVI está mediado por SFK (**Fig. 1.24**) (Estevez & Du, 2017).

La GPIb-IX y la integrina α_{IIb}/β_3 también han sido asociadas con receptores ITAM. Sin embargo, parece que su principal señalización no requiere la vía de señalización ITAM, pero la señalización ITAM juega un papel importante en la amplificación de la señalización iniciada por estos receptores, lo que produciría un aumento en la respuesta plaquetaria (Zhi *et al.*, 2013).

Esta hipótesis se sostiene debido a que los datos demuestran que la GPIb-IX activa la adhesión estable plaquetaria al vWF y el *spreading* plaquetario mediado por la integrina no es inhibido por inhibidores de Syk, la cual sería una enzima clave en la vía ITAM, a diferencia de la secreción y agregación plaquetaria secundaria dependiente de ITAM, inducida vía GPIb-IX y la vía de señalización de integrina. También se ha descubierto la asociación de Syk con filamina A, que también interactuaría con el dominio citoplásmico GPIb α , regulando la señalización ITAM inducida por GPVI (Estevez & Du, 2017).

1.2.4.1.2.2. Señalización de la activación plaquetaria mediada por receptores de reconocimiento de patrones

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son moléculas tales como ADN, ARN, glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) producidos por microorganismos. Los patrones moleculares asociados a los daños (DAMPs) son moléculas [derivados lipídicos oxidados, fragmentos

Introducción

de ADN y proteínas, como el grupo box 1 de alta movilidad (HMGB1)] liberadas en respuesta al daño tisular. Tanto los PAMPs como los DAMPs son reconocidos por los receptores de patrones de reconocimiento, tales como los receptores Toll-like (TLR), dominio oligómero de unión a nucleótidos (NOD), y el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE), actuando como señales iniciadoras para la inmunidad innata y respuestas inflamatorias no infecciosas.

Se ha demostrado recientemente que los miembros de TLRs y NOD promueven la activación plaquetaria. Las plaquetas expresan varios TLR, incluyendo TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, y TLR9. Los TLR1 y TLR6 sólo se han encontrado en plaquetas humanas y no en plaquetas de ratones. Por otro lado, se ha hallado que el TLR2 es crítico para la activación plaquetaria inducida por un agonista específico sintético, Pam3CSK4 y derivados lipídicos oxidados tales como carboxialquilpirrol-fosfatidiletanolamina (Biswas *et al.*, 2016).

A su vez, el TLR9 media las señales de activación plaquetaria inducidas por carboxi alquilpirrol, aductos de proteína generados durante el stress oxidativo (Panigrahi *et al.*, 2013).

Por último, el TLR4 es un importante receptor plaquetario para LPS, media las señales que conducen a la secreción de gránulos plaquetarios en respuesta al mismo, así como también media la activación plaquetaria y la secreción inducida por HMGB1, una proteína de unión al ADN, que es liberada por monocitos y macrófagos durante la inflamación y también se almacena en los gránulos plaquetarios que son liberados durante la activación. A su vez, se sabe que la señalización de TLR2, TLR4 y TLR9 en las plaquetas depende de la proteína de diferenciación primaria mieloide codificada por el gen 88 en humanos (MyD88). Algunos datos publicados han demostrado que TLR4 media la señalización de la activación plaquetaria por MyD88 dependiente de la vía cGMP-PKG (Vogel *et al.*, 2015).

La vía de cGMP no fue investigada en las vías de señalización TLR2 y TLR9, pero se ha comprobado que estos receptores involucran a SFK y PI₃K/Akt, siendo conocidos como los activadores de la vía NO-cGMP, así como de la vía ITAM. Las plaquetas también expresan NOD2 (pero no NOD1), siendo un receptor citosólico que reconoce el dipéptido de muramilo (MDP) en todas las bacterias. La interacción MDP-NOD2 desencadena la activación plaquetaria vía MyD88, y debido a que MyD88 es activación dependiente de MAPK y de la vía de señalización NO-cGMP-PKG, producen por lo tanto, agregación plaquetaria, retracción del coágulo y trombosis (Estevez & Du, 2017) (**Fig. 1.25**).

Introducción

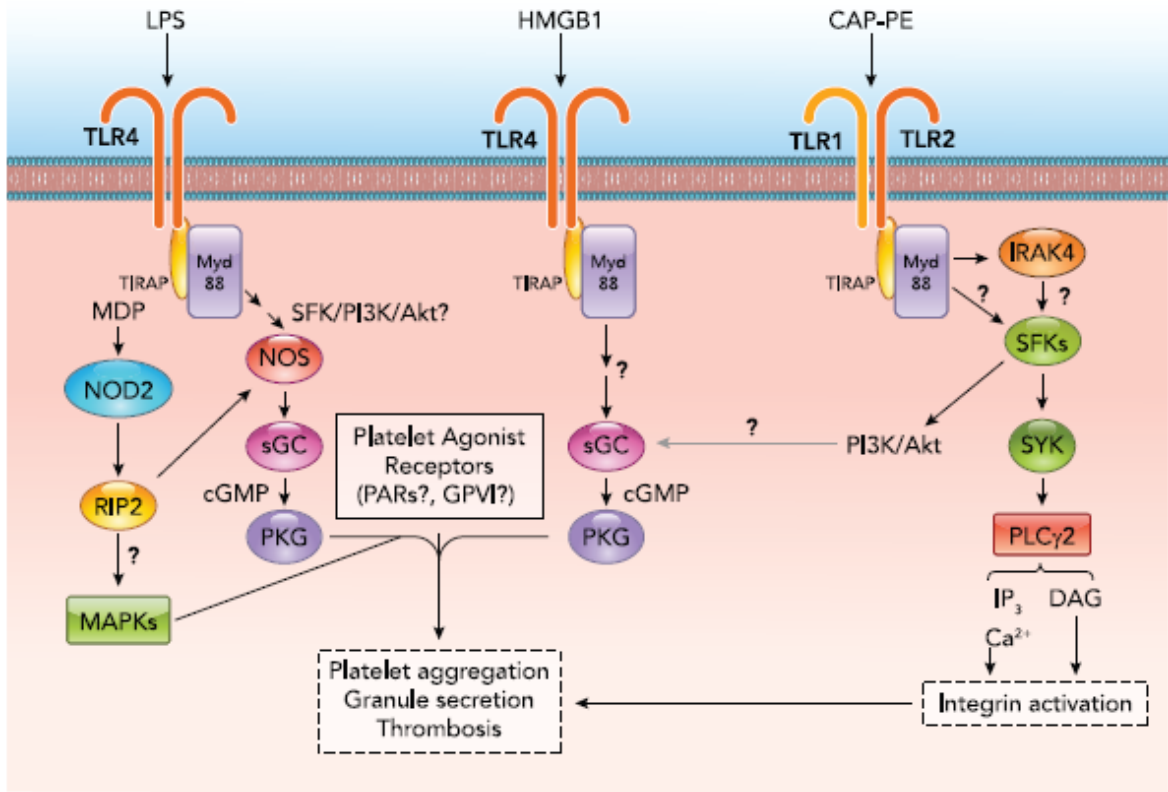


Figura 1.25. Vías de señalización de receptores de reconocimiento de patrones en plaquetas. Los receptores TLR requieren MyD88 para la señalización. LPS, lipopolisacárido; MDP, dipéptido de muramilo; HMGB1, grupo de alta movilidad 1; CAP-PE, carboxialquilpirrol-fosfatidiletanolamina; TLR, receptor tipo Toll; PKG, proteína cinasa dependiente de cGMP; RIP2, proteína 2 que interactúa con el receptor; TIRAP, proteína adaptadora que contiene dominio de receptor de interleucina-1; Myd88, factor de diferenciación mieloide 88. Los signos de interrogación representan rutas desconocidas o hipotéticas que requieren más investigación. **Tomado de Estevez & Du, 2017.**

La activación plaquetaria inducida por receptores de PAMPs probablemente actúe como un mecanismo a la respuesta trombótica por infección microbiana y daño tisular en paralelo a la inmunidad innata y la inflamación. Por el contrario, el almacenamiento plaquetario de DAMPs, como HMGB1, y su liberación durante la activación plaquetaria es probable que exacerbe la inflamación. La importancia de la activación plaquetaria y la trombosis en la inflamación y la infección se ha observado en la sepsis y durante el desarrollo de aterosclerosis (Boulaftali *et al.*, 2014).

Además de los receptores de PAMPs, ciertas especies lipídicas oxidadas (DAMPs) pueden estimular las plaquetas vía GPIV, implicando la vía de señalización MAPK quinasa (Chen *et al.*, 2009).

Se sabe que la activación de plaquetas durante la respuesta inmune e inflamatoria también puede ser estimulada por otros fármacos trombóticos y estímulos inflamatorios, tales como los complejos antígeno-anticuerpo a través de la vía Fc/ γ RIIa-ITAM, así como también la activación plaquetaria por Tr o PAF a través de la vía de la proteína G (Estevez & Du, 2017).

1.2.4.1.2.3. Señalización de la activación plaquetaria mediada por receptores acoplados a proteína G

Las plaquetas pueden ser activadas por muchos agonistas solubles, algunos de los cuales se liberan de los sitios de lesión de los vasos sanguíneos e inflamación o de las plaquetas durante la activación plaquetaria. Estos agonistas activan plaquetas uniéndose a sus respectivos receptores sobre la membrana, la mayoría de los cuales son receptores acoplados a proteína G (GPCR). Los GPCR son una familia de proteínas de membrana con siete dominios transmembrana, que tras la activación por sus ligandos provocan la señalización intracelular mediante la activación de proteínas unidas a nucleótidos guanina heterotriméricas (proteínas G) (Offermanns *et al.*, 2006).

Las proteínas heterotriméricas G consisten en una subunidad α en el complejo asociado con las subunidades β y γ . En el estado inactivo, en el que el complejo de proteína G está asociado al receptor, la subunidad α está unida a guanosina difosfato (GDP) y complejada con las subunidades β y γ . La unión de un agonista a la GPCR induce cambios conformacionales que activan el intercambio de GDP por guanosina trifosfato (GTP) en la subunidad $G\alpha$. Por consiguiente, la subunidad $G\alpha$ unida a GTP se disocia de las subunidades $\beta\gamma$ y del receptor. La subunidad α ligada a GTP y la subunidad $\beta\gamma$ luego interactúan con sus respectivas proteínas efectoras, produciendo señales de propagación (Koseoglu *et al.*, 2013).

El GTP unido a $G\alpha$ propaga la señal que es finalizada por la hidrólisis de GTP, que es mediada por la actividad GTPasa intrínseca de las subunidades $G\alpha$, acelerada por la unión de un regulador de la señalización de la proteína G (RGS) dentro del dominio de las proteínas miembros de la familia RGS. Las proteínas heterotriméricas G se agrupan en cuatro clases, basadas en la homología de la secuencia primaria de la subunidad $G\alpha$ y sus efectos sobre dianas intracelulares *hacia adentro de la célula*: $G\alpha_{1/0/z}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, y $G\alpha_{12/13}$ (Oldham *et al.*, 2008).

1.2.4.1.2.3.1. $G\alpha_q$

Tras la activación de los GPCR acoplados con $G\alpha_q$, $G\alpha_q$ se disocia del receptor y se une y activa la isoenzima PLC β que cataliza la hidrólisis de PIP2 para formar los segundos mensajeros IP3 y DAG. Se sabe que las plaquetas $G\alpha_q$ nulo son defectuosas en la liberación de IP3 y no pueden movilizar el calcio en respuesta al agonista estimulante GPCR. El $G\alpha_q$ es crítico para la agregación plaquetaria en respuesta a la mayoría de los agonistas plaquetarios GPCR (Tr, ADP, 5HT, PAF y TxA₂) y es indirectamente importante en la respuesta plaquetaria a proteínas de adhesión tales como Col, que requieren la amplificación de la señalización inducida por TxA₂, ADP, etc. para una activación plaquetaria óptima (Cho *et al.*, 2003).

1.2.4.1.2.3.2. $G\alpha_{12/13}$

Se sabe que una vía clásica de señalización $G\alpha_{12/13}$ es la unión de GTP- $G\alpha_{13}$ (o $G\alpha_{12}$) a los factores de intercambio de nucleótidos de la guanina (GEF) para la GTPasa RhoA pequeña, incluyendo la p115RhoGEF, LARG, y GEF-H1, activando RhoA y Rho quinasa (ROCK), promoviendo posteriormente la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y la contracción dependiente de actina-miosina (Goggs *et al.*, 2015).

Las plaquetas expresan tanto $G\alpha_{12}$ como $G\alpha_{13}$; sin embargo, sólo $G\alpha_{13}$ es necesaria para la activación a dosis bajas de Tr o U46619 (análogo de TxA₂) induciendo la secreción y agregación plaquetaria. Las plaquetas $G\alpha_{13}$ nulas también muestran defectos en los cambios de forma plaquetaria inducidos por Tr y por U46619, lo cual es consistente con defectos en la activación de RhoA y la fosforilación de MLC, secreción de gránulos, y retracción del coágulo (Getz *et al.*, 2010).

La RhoA no puede ser directamente requerida para la activación de la integrina y la agregación plaquetaria *per se*, y las plaquetas RhoA-nulas mostraron mejores respuestas de agregación al colágeno y CRP (Pleines *et al.*, 2012).

Por otro lado, se demostró que el $G\alpha_{13}$ unido a GTP directamente interactúa con el dominio citoplásmico de la subunidad β_3 de la integrina α_{IIb}/β_3 y que esta interacción es importante en la señalización de la misma *de adentro hacia afuera*. Curiosamente, la unión de $G\alpha_{13}$ a β_3 inhibe potentemente la activación de RhoA, proporcionando un mecanismo regulado dinámicamente por RhoA y contractilidad dependiente de RhoA (Gong *et al.*, 2010).

1.2.4.1.2.3.3. G_1 y G_s

Se conoce que el receptor acoplado con $G\alpha_1$ típico es el receptor de ADP, P_2Y_{12} , y que el receptor acoplado $G\alpha_s$ típico es el receptor de prostaglandina, I2 PTGIR (receptor IP). Las $G\alpha_{1/0}$ y $G\alpha_s$ se unen a adenilil ciclasa, con inhibición de $G\alpha_1$, pero estimulación de la función de la adenilil ciclasa para sintetizar cAMP (Offermanns *et al.*, 2006).

El cAMP estimula la proteína quinasa dependiente del cAMP (PKA), jugando un papel crítico en el estado de reposo plaquetario, que es el mecanismo por el cual PGI2 inhibe la activación plaquetaria. Por el contrario, $G\alpha_1$ inhibe la síntesis del potente segundo mensajero inhibidor de plaquetas cAMP, siendo de importancia crítica en la activación plaquetaria (Raslan *et al.*, 2014).

Se sabe que las plaquetas expresan varios miembros de la familia $G\alpha_1$, incluyendo $G\beta_{12}$, $G\alpha_{13}$ y $G\alpha_z$. A su vez, los defectos hallados en la isoforma $G\alpha_{12}$ causan sólo una falla parcial en la inhibición inducida por el agonista sobre la síntesis de cAMP, llegándose así a la conclusión de que la $G\alpha_1$ estimula la activación plaquetaria no sólo mediante la cAMP sino también a través de mecanismos independientes de cAMP (Lova *et al.*, 2003).

En particular, durante la activación de la $G\alpha_1$ y la disociación de $G\beta\gamma$ se sabe que interactúa con la $PI_3K\gamma$ y que posiblemente activa las isoformas β de PI_3K , siendo importante en la señalización G_1 . Se ha demostrado en varios trabajos que la vía de la $G\alpha_1$ también desempeña funciones en la activación de la pequeña proteína 1B relacionada con la unión GTP unida a RAS (Rap1b), así como que Rap1b es el regulador de RASA3 (Stefanini *et al.*, 2016), y en la activación de SFK (Xiang *et al.*, 2012).

La proteína RASA3 fue originalmente purificada de la membrana plasmática de plaquetas humanas en el año 1994, pero su función en la biología plaquetaria fue dilucidada recientemente en modelos de estudio con ratones transgénicos (Stefanini *et al.*, 2015). Se sabe que funciona a través de la interacción con el complejo RAP-GAP (Stefanini *et al.*, 2016) (**Fig. 1.26**).

Introducción

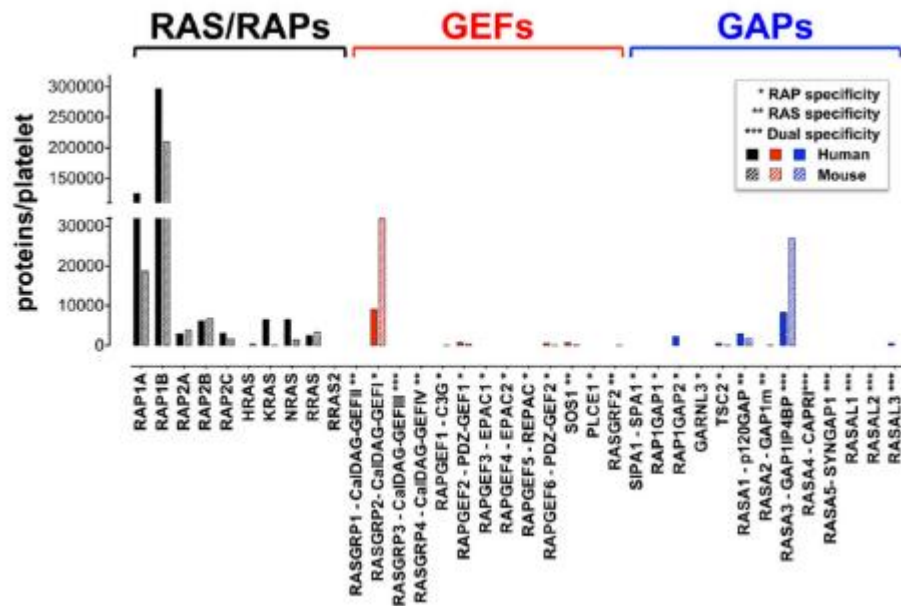


Figura 1.26. Expresión de proteínas RAS/RAPs, GEFs y GAPs en plaquetas. Niveles estimados de proteína basados en el análisis proteómico cuantitativo completo de plaquetas humanas (Buckhart et al., 2012) barras completas y ratón (barras a rayas). El CalDAG-GEFI y el RASA3 son los reguladores RAP más abundantes expresados tanto en plaquetas humanas como de ratón. **Tomado de Stefanini et al., 2016.**

Las GTPasas más abundantes en plaquetas son dos isoformas de proteínas RAS relacionadas con la subfamilia de proteínas (RAP o Rap), Rap1b (~300.000 copias/plaqueta) y Rap1a (~125.000 copias/plaqueta). Las proteínas Rap son interruptores moleculares que pasan del estado inactivo, unidas a GDP, al estado activo, unidas a GTP. Este pasaje es controlado por dos clases de proteínas regulatorias. Los factores que intercambian el nucleótido guanina (GEFs) promueven la activación por estimulación del intercambiador de GDP por GTP, y las proteínas que activan las GTPasas (GAPs) terminan la activación por hidrólisis catalítica del GTP (Bos *et al.*, 2007).

La proteína RASA3 pertenece a la subfamilia de cuatro proteínas GAP1 (GAP1m/RASA2, RASA3, RASAL1 y CAPRI/RASA4) caracterizadas estructuralmente por un dominio GAP flanqueado al N-terminal por dos dominios C2 en tándem y el C-terminal del dominio de una pleckstrina homóloga vinculado a 26 aminoácidos pertenecientes al motivo Btk (PH/Btk). El dominio catalítico es un dominio convencional RAS-GAP que tiene la particularidad de estimular la actividad de la GTPasa de ambas RAS- y RAP-GTPasas, dependiendo del contexto celular. Esta plasticidad catalítica es mediada

Introducción

por las regiones flanqueadas N- y C-terminal, las cuales orientan los residuos catalíticos RAP-GTP de una manera que permita que RAP secuestre la maquinaria catalítica RAS-GAP (Sot *et al.*, 2010).

Los dominios C2 de RASA3 son no canónicos y por lo tanto no se unen a Ca^{2+} o fosfolípidos. No tienen otra función conocida aparte de su función esencial en ayudar a la activación de RAP-GAP. Contrariamente, el dominio PH/Btk, además de su función estérica en la reacción catalítica, es crucial para la localización en la membrana plasmática de RASA3 y se presume que regula dinámicamente la actividad de GAP en respuesta a la estimulación celular (Stefanini *et al.*, 2016) (**Fig.1.27**).

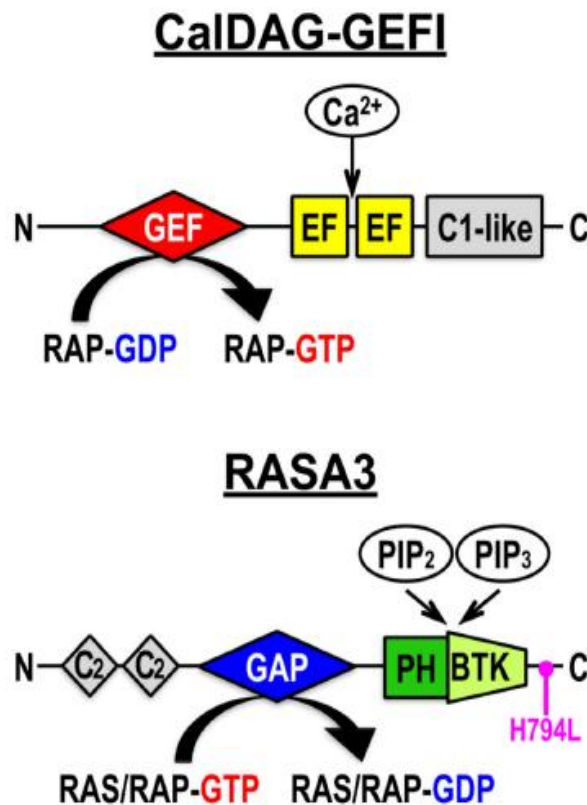


Figura 1.27. Estructura del dominio de los reguladores RAP1, CalDAG-GEFI y RASA3. El CalDAG-GEFI consiste en un dominio de intercambio de nucleótidos de guanina catalítico específico de RAP (GEF), un par de dominios EF de unión a Ca^{2+} (EF) y un dominio de tipo C1 de función hasta ahora desconocida que es necesario para una actividad óptima de RAP-GEF. El RASA3 consiste en un dominio de proteína activadora de GTPasa catalítica (GAP) específico para RAS y RAP, flanqueado por un par de dominios C2 y por un dominio PH/Btk que se une al fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). La cepa de ratones mutantes *Rasa3^{h1b}* se caracteriza por una única mutación puntual (H794L) en la región C-terminal de RASA3. GTP (guanosina trifosfato), GDP (guanosina difosfato). **Tomado de Stefanini *et al.*, 2016.**

Estos estudios demuestran que existe una minuciosa regulación del balance entre los reguladores antagónicos RAP1, CalDAG-GEFI y RASA3, siendo críticos tanto para la prevención de la activación plaquetaria prematura en circulación, así como también para la formación del tapón hemostático en sitios de injuria vascular. En las plaquetas que circulan por los vasos sanos, se requiere la activación de RASA3 en la membrana plasmática para antagonizar la alta sensibilidad modulada por

Introducción

la señalización CalDAG-GEFI/RAP1, que mantiene a las células en estado quiescente (**Fig.1.28**, panel de la izquierda). Cuando sucede la injuria vascular (**Fig.1.28**, panel central), la estimulación plaquetaria vía GPCRs y acoplada a receptores los ITAM resulta en un incremento del nivel de Ca^{2+} citosólico y la liberación de ADP proveniente de los gránulos de reserva. El complejo CalDAG-GEFI es activado por pequeños cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico, produciendo la activación rápida de RAP1 y la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. La señalización CalDAG-GEFI, sin embargo, es reversible y regresa a la línea de base cuando los niveles citosólicos de Ca^{2+} se normalizan. Por lo tanto, la activación que sostiene la integrina y la facilidad para la formación de tapones hemostáticos, así como la actividad de RASA3 deben ser reducidas como parte de la respuesta de la activación. La señal requerida es proporcionada a través del acoplamiento del ADP al receptor P2Y12 y la señalización por PI_3K . Por otro lado, se ha dilucidado que los inhibidores de P2Y12, como el clopidogrel bisulfato, protegen de la trombosis inhibiendo la hemostasia primaria, previniendo la inactivación de RASA3 e impidiendo de esta manera la señalización (**Fig.1.28**, panel de la derecha) (Stefanini *et al.*, 2016).

Aún quedan por responder varias preguntas sobre la señalización de RAP1 en plaquetas. Por ejemplo, sería interesante averiguar si la función plaquetaria está afectada y de qué manera, por RAP GEFs y GAPs que no sean CalDAG-GEFI y RASA3, los cuales se expresan en niveles bajos en estas células. También falta información importante con respecto a la regulación de la actividad de CalDAG-GEFI y RASA3 mediante el compromiso de sus dominios reguladores o modificaciones postraduccionales dentro de estas proteínas. En cuanto al RAP en sí, sería interesante determinar si hay redundancias funcionales, así como contribuciones únicas de las diversas isoformas RAP a la activación plaquetaria, y qué efectores proteicos unen a RAP según la respuesta plaquetaria, especialmente durante la activación de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ dependiente de Ta (Stefanini *et al.*, 2016).

De acuerdo con lo expuesto, se precisarían más estudios sobre la relevancia clínica de las alteraciones en la señalización plaquetaria RAP1. Por ejemplo, algunos trastornos hereditarios de la función o número de las plaquetas pueden, al menos en parte, explicarse por las variaciones génicas en las moléculas clave de la vía RAP. La hipo- o hiperreactividad plaquetaria observada entre individuos o como resultado de ciertos estados patológicos puede ser el resultado de la variabilidad interindividual o adquirida en el equilibrio antagonista entre CalDAG-GEFI y RASA3 (expresión y/o actividad). Encontrando las respuestas a dichos mecanismos se podrían dilucidar mejor las vías de activación,

permitiendo de esta manera enfocar la terapia anti-plaquetaria de una manera más personalizada (Stefanini *et al.*, 2016).

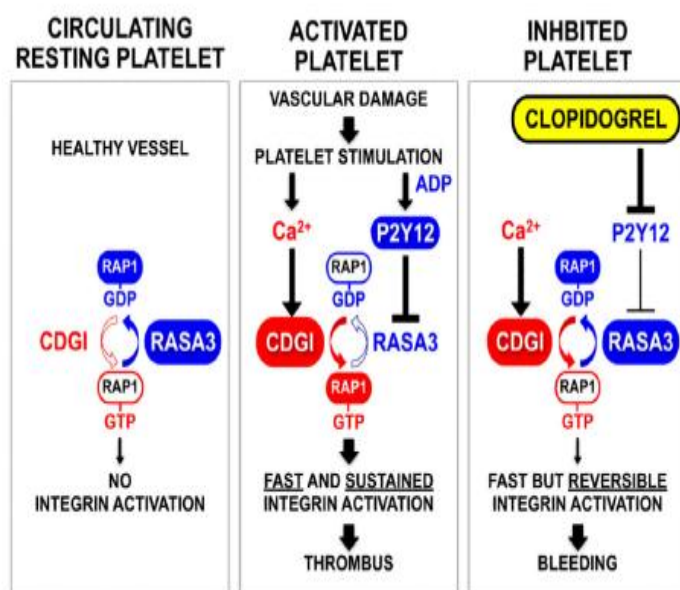


Figura 1.28. Modelo esquemático de regulación plaquetaria dependiente de RAPI. **Panel izquierdo.** En las plaquetas que circulan en los vasos sanguíneos RASA3 es activo para restringir la activación de RAPI no controlada y mantener un estado quiescente, no adhesivo (sin activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$). **Panel central.** En los sitios de lesión vascular, la estimulación de las plaquetas da como resultado un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico y la liberación de ADP a partir de gránulos densos. El Ca^{2+} activa CalDAG-GEFI, que media la rápida carga de GTP al RAPI. El ADP estimula al receptor P2Y12, lo que conduce a la disminución de la función RASA3 y la sostenida señalización RAPI. La activación rápida y sostenida de RAPI/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ da como resultado la formación de trombos tridimensionales estables sobre una amplia gama de condiciones de cizallamiento hemodinámico. **Panel derecho.** Los inhibidores de P2Y12, como el clopidogrel, previenen la inactivación de RASA3, prohíben la señalización RAPI sostenida y desestabilizan el trombo en crecimiento. **Tomado de Stefanini *et al.*, 2016.**

1.2.4.1.2.4. Sinergismo entre las diferentes vías de receptores de activación plaquetaria

Varios agonistas plaquetarios tienen más de un receptor en plaquetas, y la activación plaquetaria óptima inducida por estos agonistas a menudo requiere sinergismo o cooperatividad entre las diferentes vías de los receptores implicados. Por ejemplo, el ADP liberado de los gránulos densos plaquetarios o de las células y tejidos dañados requiere tanto de $G\alpha_q$ acoplado a P_2Y_{12} como de $G\alpha_1$ para la señalización necesaria para la activación plaquetaria. La activación plaquetaria defectuosa se presenta cuando cualquiera de estos dos receptores o sus proteínas G asociadas son bloqueadas o deficientes. Por lo tanto, la cooperatividad de la vía G1 y Gq es necesaria para la activación plaquetaria inducida por ADP. Por otra parte, el TxA_2 tiene un solo receptor (TP), pero sin embargo está acoplado tanto a $G\alpha_q$ como a $G\alpha_{12/13}$, siendo ambas clases de proteínas G importantes para una respuesta plaquetaria óptima, particularmente a dosis bajas, sugiriendo sinergia entre las dos diferentes vías (Offermanns *et al.*, 2006).

Introducción

La activación plaquetaria inducida por Tr involucra un receptor más complejo y varias vías de señalización. La Tr tiene al menos tres receptores en la superficie de las plaquetas: PAR1, PAR4 y GPIb-IX en plaquetas humanas y PAR3, PAR4, y GPIb-IX en plaquetas de ratón, en donde se sugiere que PAR3 sería un puente para el clivaje eficiente y la señalización vía PAR4. Tras la estimulación con la Tr, se ha sugerido que PAR1 formaría heterodímeros con PAR4 que mejorarían la disociación de PAR4. Además, se sabe que PAR4 y P2Y12 dimerizan, y su interacción promueve la señalización PAR, que conduce a la activación Akt (Khan *et al.*, 2014).

Se ha hallado que PAR1 y PAR4 están acoplados ambos a $G\alpha_q$ y $G\alpha_{13}$ y posiblemente a la vía de $G\alpha_1$ (este es un hallazgo controversial, es un acoplamiento indirecto que fue informado en algunos trabajos). La Tr se une y cierra estos GPCRs para exponer una nueva secuencia NH_2 -terminal, que sirve como un ligando interno para interactuar y activar estos receptores. El papel de los receptores no-GPCR, como por ejemplo el receptor GPIb-IX, ha sido controvertido en la activación de plaquetas inducidas por Tr. Mientras que algunos investigadores propusieron que el GPIb-IX serviría de *muelle* de Tr que promueve la escisión de la misma de los PAR, otros sugirieron que GPIb-IX transmitiría señales de activación plaquetaria independiente de los PAR. Sin embargo, algunos trabajos recientes indican que GPIb-IX no es un *muelle pasivo* para la Tr ni un receptor de Tr independiente de PAR, sino que la cooperación mutua entre señalización de GPIb-IX inducida por Tr y la señalización PAR es necesaria para una respuesta plaquetaria óptima. La sinergia de estos diferentes receptores aumenta considerablemente la sensibilidad de las plaquetas a bajas concentraciones de Tr, lo cual es importante para la trombosis arterial (Estevez *et al.*, 2016; Estevez & Du, 2017) (**Fig. 1.29**).

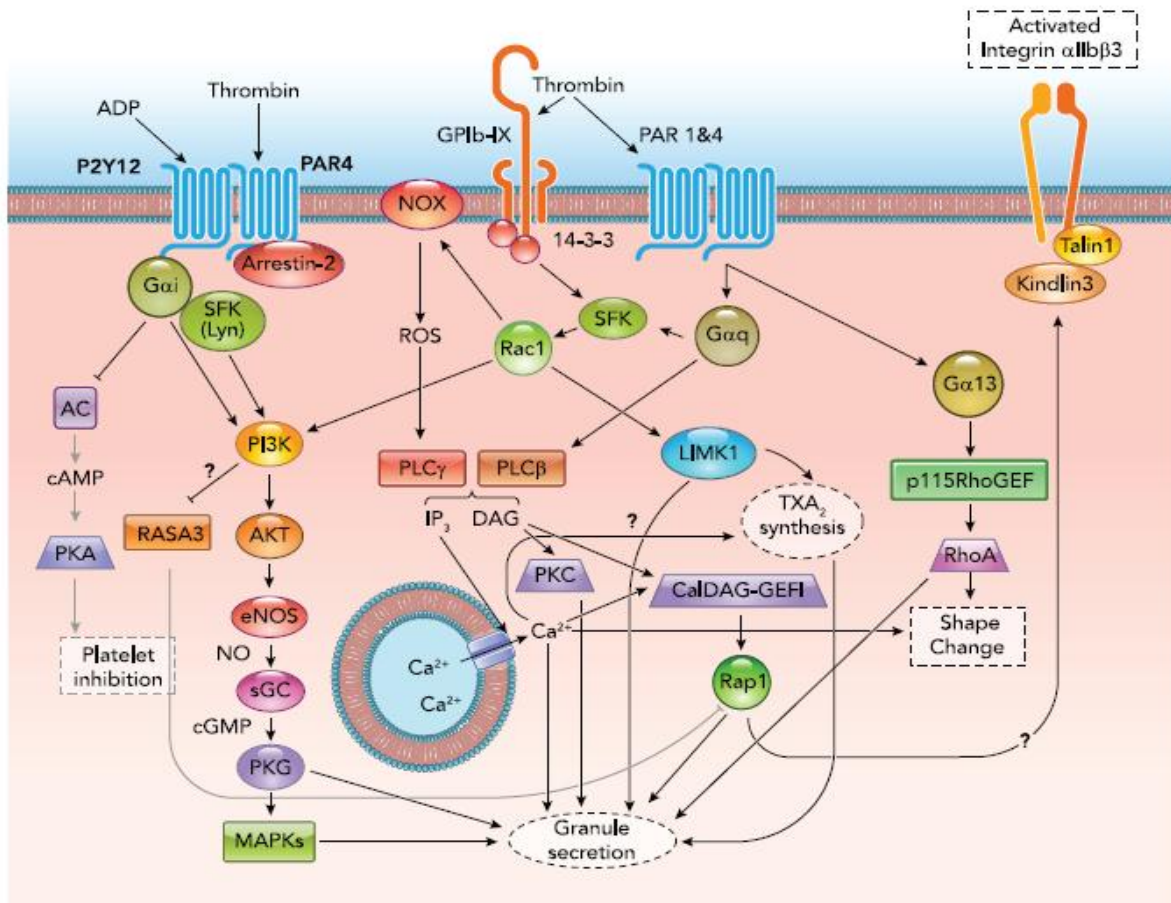


FIGURA 1.29. Sinergismo entre múltiples vías de señalización del receptor de Tr. P115 RhoGEF, p115 Rho factor de intercambio de nucleótidos de guanina; PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc; AC, adenilil ciclasa; Rap1b, proteína 1b relacionada con RAS; DAG, diacilglicerol; IP3, 1,4-trisfosfato de inositol; ROS, especies reactivas del oxígeno; NOX, NADPH oxidasa. Tomado de Estevez & Du, 2017.

1.2.4.1.2.5. Redes de amplificación de señales

Los receptores de diversos agonistas plaquetarios y ciertas proteínas adhesivas transmiten signos de activación plaquetaria; estas vías de señalización de receptores divergentes convergen en vías de señalización común, que amplificarían en gran medida las señales del receptor inicial, conduciendo a respuestas plaquetarias importantes.

1.2.4.1.2.5.1. Fosfolipasa C (PLC), elevación de calcio y diacilglicerol

La PLC es como un centro sobre el cual convergen numerosas vías de señalización de activación plaquetaria. Las plaquetas expresan al menos tres familias de PLC: PLC β , PLC γ , y PLC δ . En plaquetas humanas PLC γ , PLC β 2 y PLC β 3 parecen ser los miembros de la familia PLC predominantemente expresados. Las PLC β y PLC γ se activan a través de diferentes mecanismos. Se sabe que la PLC β se activa primero por unión a G α_q y luego por fosforilación de la proteína tirosina quinasa mediada por Syk. Esta diferencia en la regulación es impartida por un dominio COOH terminal que se encuentra en PLC β y que no se encuentra presente en PLC γ . Contrariamente, PLC γ contiene SH2, SH3, y dominios de PH divididos que no se encuentran en el PLC β . Sin embargo, algunos trabajos recientes sugieren que G α_q , el cual se acopla a agonistas, como la Tr, también produciría fosforilación y activación de PLC γ a través de la vía de señalización ROS-dependiente (Delaney *et al.*, 2016).

Inversamente, los agonistas ITAM, como el Col, inducen la liberación de los agonistas de GPCR, tales como ADP y TxA₂, que activan indirectamente PLC β a través de la vía Gq. Se sabe que, entre sus principales funciones, la PLC cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP₃). El IP₃ se une al receptor IP₃, produciendo la liberación de Ca²⁺ del STD del citosol, siendo un importante mecanismo de elevación de la concentración de calcio. La liberación de Ca²⁺ mediada por el receptor IP₃ y posterior agotamiento de Ca²⁺ intracelular estimularía la liberación de calcio almacenado (SOCE), causando una elevación sostenida del Ca²⁺ intracelular, siendo el papel central en la activación plaquetaria inducida por agonistas, crítico para muchos fármacos intracelulares que participan en la señalización de eventos, incluyendo la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y la activación de muchos fármacos dependientes del calcio, proteínas incluyendo PKC, calpaina y calmodulina (Varga-Szabo *et al.*, 2009).

La elevación del calcio intracelular es necesaria para casi todas las funciones plaquetarias, incluyendo adhesión, cambio de forma, agregación, secreción, exposición de actividad procoagulante y retracción del coágulo. El DAG activa tanto las isoformas de la PKC (α , β), como las nuevas isoformas (δ , θ , η , ϵ), que son también importantes para la activación de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ y la secreción de gránulos plaquetarios (**Fig. 1.29**) (Estevez & Du, 2017).

Introducción

Las elevaciones en la concentración del Ca^{2+} intracelular también conducen a la activación del factor de intercambio de nucleótidos I, la guanina regulada por Ca^{2+} y DAG (CalDAG - GEF1). A su vez, el DAG podría estar involucrado en la activación de CalDAG-GEFI, aunque dicho complejo tiene un sitio atípico de unión de baja afinidad para DAG. Además, el CalDAG-GEFI es fundamental para la activación de la GTPasa pequeña, la proteína relacionada con RAS1b (Rap1b), que es importante para la secreción de gránulos y para la señal *de adentro hacia afuera* que conduce a la activación de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Czikora *et al.*, 2016).

1.2.4.1.2.5.2. Vía de la fosfoinositida 3-quinasa (PI_3K)-Akt

La vía de señalización PI_3K -Akt induce a la liberación de gránulos plaquetarios y es importante tanto para la activación como para la adhesión estable de plaquetas inducida por la señalización de la integrina externa GPIb-IX y la señalización por ITAM (Yin *et al.*, 2008a y 2008b).

Sin embargo, la vía de señalización PI_3K -Akt no es necesaria para la activación plaquetaria inducida por agonistas de GPCR, pero serviría para la amplificación de la señalización de GPCR. Entre las diferentes especies de fosfoinositida, el fosfatidilinositol- 3, 4, 5- trifosfato (PIP3) se convierte principalmente en PIP2 por la PI_3K clase I que fosforila la posición 3 en el anillo inositol PIP2. La estimulación por agonistas induce la activación de PI_3K y por lo tanto la generación de PIP3, que media la translocación de la membrana de la quinasa dependiente de 3-fosfoinositida 1 (PDK1) y las isoformas Akt, a través de la vía de PIP3 que se une a los dominios de PH en estas proteínas, permitiendo la fosforilación mediada por PDK1 y la activación de Akt. Las tres isoformas de Akt se expresan en plaquetas, y la forma *knockout* de cualquiera de ellas reduce la dosis de Tr a bajas concentraciones y el U46619 induce la secreción y la agregación plaquetaria de la segunda onda dependiente de la secreción (O'Brien *et al.*, 2011).

Las formas *knockout* de Akt1 o Akt2 también disminuyen la activación plaquetaria inducida por vWF/GPIb-IX, pero sólo la supresión de Akt1 afecta significativamente la secreción y agregación plaquetaria inducida por Col. Las isoformas Akt, predominantemente Akt3, son importantes también en la señalización de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ para promover el *spreading* plaquetario. Se han hallado dos efectores de Akt que han demostrado mediar la señalización PI_3K -Akt, conduciendo a la secreción de gránulos y a la activación plaquetaria de la NOS y la glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β); esta última es una serina-treonina quinasa dirigida por prolina que se identificó inicialmente como un agente

de fosforilación y un agente de inactivación de la glucógeno sintasa. La isoforma GSK3 β participa en el metabolismo energético, el desarrollo de células neuronales y la formación de patrones corporales. Las plaquetas expresan NOS endotelial, que es fosforilado y activado por Akt, y estimula la ruta del cGMP que conduce a la secreción de gránulos y a la activación plaquetaria dependiente de GPIb-IX. Sin embargo, la GSK3 β juega un papel diferente en las distintas vías de activación plaquetaria: desempeña el papel de inhibidor de la Tr, mediante Akt a través de la fosforilación y la inhibición de GSK3 β , pero por otro lado, promueve la activación plaquetaria inducida por Col (O'Brien *et al.*, 2011).

Sería poco probable, entonces, que el papel de Akt en la activación plaquetaria inducida por Col sea mediado por GSK3 β , mientras que el papel de Akt en la señalización de $\alpha_{IIb}\beta_3$, es mediado principalmente por la fosforilación e inhibición de GSK3 β , que ha demostrado regular negativamente la propagación de plaquetas, la retracción del coágulo y la estabilidad del trombo (Laurent *et al.*, 2015).

Sin embargo, el mecanismo de acción de la GSK3 β no se conoce. Actualmente, algunos trabajos sugieren un papel importante para PI₃K2 α clase II, en la morfología plaquetaria y la estabilidad del trombo bajo flujo (Valet *et al.*, 2015).

Por otro lado, las fosfatasas de lípidos, tales como PTEN, hidrolizan PIP3 e inhiben tanto la vía de PI₃K-Akt como la vía de señalización cGMP (Weng *et al.*, 2010).

1.2.4.1.2.5.3. Señalización a través de cGMP.

El monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) es sintetizado por guanilil ciclasas (GC) en muchos tipos celulares, incluyendo las plaquetas, y juega un papel en la activación de las PKG dependientes de cGMP.

Se sabe que los agonistas plaquetarios estimulan la elevación del cGMP y análogos exógenos de cGMP, pudiendo tener un efecto estimulante sobre las plaquetas; este concepto ha sido arraigado desde la década de los ochenta. A su vez, se sabe que la vía NO-cGMP es el principal regulador negativo de la activación plaquetaria, siendo la guanilil ciclasa soluble (sGC) activada por el NO y por los compuestos dadores de NO, que elevan dramáticamente el cGMP en las plaquetas, inhibiendo la activación plaquetaria. Sin embargo, a pesar del desarrollo de muchos compuestos en la época de 1980 que imitaban o elevaban el cGMP, ninguno surgió como una droga anti-plaquetaria eficaz.

Recientemente este concepto ha sido cuestionado por el descubrimiento de los papeles bifásicos de la vía de señalización NO-cGMP-PKG en la regulación de la activación plaquetaria. Se ha hallado

que concentraciones bajas de NO y cGMP sintetizados endógenamente durante la activación de las plaquetas y de forma significativa aumentan la sensibilidad de las plaquetas a bajas concentraciones de agonistas, elevando la importancia de las vías de activación plaquetaria. Además, las importantes funciones estimuladoras de la vía cGMP-PKG en la señalización de la activación plaquetaria por los receptores de reconocimiento de patrones (PAMPs y DAMPs) ha sido reportado por diferentes grupos de investigación (Vogel *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Sólo a altas concentraciones de NO (provenientes de donantes de NO) y de los análogos de cGMP se evidenció un efecto inhibitorio sobre la activación plaquetaria, la elevación de cAMP dependiente de cGMP y la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP, aunque la PKG también puede desempeñar un papel en la fase inhibitoria. Por lo tanto, el papel bifásico de la vía cGMP en la activación plaquetaria, probablemente sea un mecanismo de auto-limitación de la estimulación de la respuesta plaquetaria, para mantener niveles bajos de trombosis e inflamación (Zhang *et al.*, 2011).

Durante la activación plaquetaria, las plaquetas sintetizan biológicamente especies lipídicas activas llamadas eicosanoides, que funcionan como segundos mensajeros. La síntesis de eicosanoides requiere la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (PLA2) dependiente de calcio, que hidroliza fosfolípidos de membrana para liberar ácido araquidónico (AA). El AA se metaboliza a través de las vías de la ciclooxigenasa (COX) y de la lipoxigenasa (Adler *et al.*, 2008).

Por otro lado, las COXs, que son inhibidas por la aspirina, inician la conversión de AA en prostaglandinas (PG). De las PG sintetizadas en plaquetas, el TxA₂ es un agonista plaquetario potente y cumple una función importante en el aumento de la activación plaquetaria y promoción de la formación de trombos uniéndose a su receptor de plaquetas acoplado a Gq/G13. Las lipoxigenasas inician la conversión de AA en oxilipinas, entre las cuales el ácido 12- hidroxieicosatetraenoico (12-HETE) ha sido reportado tanto por potenciar la activación plaquetaria inducida por agonistas de PAR, FcγRIIa, o agonistas de GPVI, como por inhibir la activación plaquetaria inducida por Col y ADP (Yeung *et al.*, 2011 y 2014).

1.2.4.1.2.5.4. Secreción de gránulos como una señal de amplificación

Uno de los mecanismos comunes más eficientes de la amplificación de la señal durante la activación plaquetaria es la secreción del contenido de sus gránulos. El contenido secretado de los

gránulos no sólo participa de la señalización de la activación plaquetaria, sino también en reclutar y activar las plaquetas en reposo circulantes, facilitando la formación y el crecimiento del trombo. Además, la secreción de gránulos contribuye a la fisiología de la remodelación vascular, inflamación y reparación de heridas, aterosclerosis patológica y metástasis del cáncer (Duerschmied *et al.*, 2013; Ghasemzadeh *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2013).

Se sabe que la secreción de los gránulos puede ser estimulada por elevaciones del Ca^{2+} intracelular y por la fosforilación de proteínas SNARE, PKC, IKK y PKG. Por lo tanto, varias vías de señalización plaquetaria descritas previamente, son importantes en promover el estímulo de la secreción de los gránulos plaquetarios a través de los agonistas: 1) la elevación del calcio, 2) la señalización de la PKC, 3) la señalización de la SFK, 4) las vías de señalización PI_3K -Akt y NO-cGMP-PKG, 5) la señalización por MAPK, 6) la señalización CalDAG-GEFI y Rap1b, y 7) la señalización RhoGTPasa Rac1 y RhoA pequeña. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas vías promueven la secreción siguen siendo poco claros y serán seguramente blanco de investigaciones futuras (Estevez & Du, 2017).

1.2.4.1.2.5.5. Señalización a través de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Un paso clave de este tipo de señalización es la unión de la proteína adaptadora citosólica, Ta a un sitio en la cola citoplásmica β_3 conteniendo un motivo NPXY, que se cree que facilita una interacción secundaria con un sitio de unión proximal a la membrana sobre β_3 (Estevez & Du, 2017) (**Fig. 1.30**).

Se sugiere que estas interacciones interrumpen la conexión entre la membrana interna y externa a través de las cadenas α y β citoplásmicas y las regiones transmembrana que desencadenarían la activación de $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Se ha demostrado que la delección o mutación de la Ta en el sitio de unión sobre la cola citoplásmica β_3 empeora la activación de la integrina inducida por agonistas y la agregación plaquetaria. Por otro lado, la Ta interacciona con las *kindlins* (integrinas co-activadoras) que también son importantes en la *señalización de adentro hacia afuera*. Las *kindlins* se unen con el motivo $\beta_3\text{COOH}$ terminal NXXY distinto del sitio de unión de Ta. Varios estudios sugieren que la unión de la Ta a las *kindlins* coopera para inducir la activación completa de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Klapproth *et al.*, 2015a).

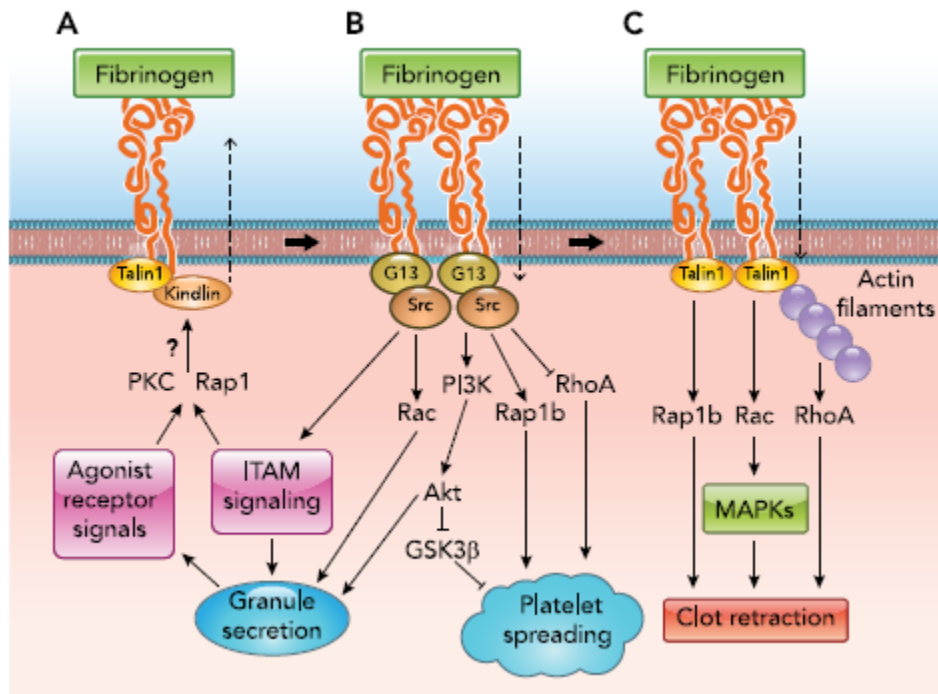


Figura 1.30. Vías de señalización de integrinas. A: Señalización *de adentro hacia afuera* de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Un paso final clave de este tipo de señalización es la unión de la proteína adaptadora citosólica Ta y las *kindlins*. Los signos de interrogación indican los mecanismos que siguen siendo poco claros y requieren más investigación. B: Integrina de fase temprana perteneciente a la *señalización de adentro hacia afuera*, que requiere la interacción entre $G\alpha_{13}$ y Src con el dominio citoplasmático β_3 . La disociación de la Ta, ocurre durante la fase temprana de la señalización. C: Integrina de fase tardía de la *señalización de adentro hacia afuera*, que requiere la reasociación de talina y la escisión de calpaína del sitio de unión de Src en la cola β_3 . **Tomado de Estevez & Du, 2017.**

1.2.4.1.3. Respuestas funcionales

1.2.4.1.3.1. Adhesión, cambio de forma, agregación y secreción

Se describió previamente que el sistema hemostático está sometido a mecanismos de control para poder tener una respuesta regulada frente a estímulos de carácter hemorrágico y/o trombótico. Por lo tanto, la función principal de la plaqueta es sellar las lesiones del árbol vascular, ya que cuando se produce una lesión las plaquetas interaccionan con proteínas que normalmente están cubiertas por el endotelio intacto. Luego de la activación, las plaquetas sufren una serie secuencial de cambios morfológicos: forma esférica, adhesión por filopodios cortos y largos, adhesión por lamelopodios y finalmente, la consolidación completa de la adhesión (Bye *et. al.*, 2016) (**Fig. 1.31**).

Finalmente, los cambios de forma son reconocidos por cuatro etapas claramente identificables:

Introducción

en la primera etapa se despolimerizan los microtúbulos, se incrementa la cantidad de F-actina, se deforma la membrana plaquetaria, se originan los lamelopodios y finalmente éstos facilitan la adhesión entre ambos bordes de la injuria vascular. Durante la segunda etapa otras plaquetas son reclutadas, lo que permite consolidar la formación de la monocapa, las cuales son activadas a través de receptores heterotriméricos G, lo que resulta finalmente en la activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (señalización *de adentro hacia afuera* descrita en el inciso 1.2.4.1.2.5.5), permitiendo la unión al Fb y la polimerización de la red de filamentos de actina. Luego, con la formación de numerosos filopodios, las plaquetas se agregan y se consolidan entre sí formando un espeso trombo plaquetario. En la tercera etapa las plaquetas se contraen a través de cordones de actina también llamados *fibras de tensión*, ancladas en las zonas de adhesión. Estas cuerdas de actina se expanden y contraen, dando como resultado la secreción de moléculas pro-coagulantes y factores de crecimiento que contribuyen a la reparación de la injuria vascular. Finalmente durante la cuarta etapa se produce la secreción y las plaquetas incrementan pasivamente los agregados formados. La proteína P-selectina del gránulo α que se expresa durante la activación es blanco de las células polimorfonucleares y de los monocitos/macrófagos, los cuales *limpian* la zona de los restos plaquetarios y de fibrina (Bye *et. al.*, 2016) (Fig. 1.31).

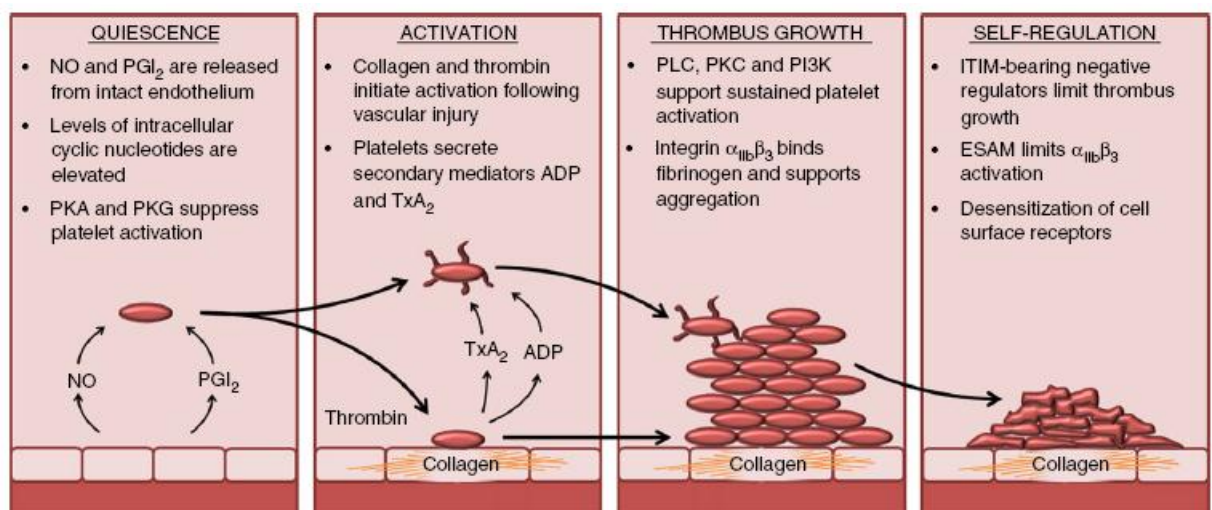


Figura 1.31. Esquema de las etapas de la activación plaquetaria y formación de trombos. Tomado de Bye *et al.*, 2016.

Introducción

En la **Tabla 1.V** podemos observar en forma esquemática los principales agonistas, mecanismos de transducción de señales, nodos comunes entre las diferentes vías, redes de amplificación de señales, fases de activación en base a los nuevos conceptos, respuestas funcionales y mecanismos autorreguladores de retroalimentación negativa detallado previamente en el inciso **1.2.4.1**.

Tabla 1.V. Principales mecanismos de la activación y agregación plaquetaria.

| Agonistas | Mecanismos de activación: Tres vías de transducción de señales | Mediadores clave: nodos comunes | Redes de amplificación de señales | Fases de la activación | Respuestas funcionales | Mecanismos autorreguladores de retroalimentación negativa |
|-------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| Adhesión | A. Receptores de adhesión | PLC | PLC, aumento de calcio, DAG | Señalización divergente temprana de receptores | Adhesión, cambio de forma, agregación y secreción | ITIM |
| Col | • GPIb-IX | | | | | |
| Tr | • ITAM | | | | | |
| TxA ₂ | GPVI | PKC | PI ₃ K, PKB (Akt) | Convergencia de las vías de señalización tempranas y amplificación de redes de señales | | ESAM |
| ADP | CLEC-2 | | | | | |
| Fb | B. Receptores de reconocimiento de patrones | PI ₃ K | cGMP | | | |
| TPS | • PAMPs | | | | Expresión de la actividad procoagulante y formación de micropartículas | Fosfatasa |
| vWF | • DAMPs | | | | | |
| Epinefrina | C. Receptores acoplados a proteína G inducido por agonistas solubles | | Secreción de gránulos | Señalización de <i>adentro hacia afuera</i> ($\alpha_{IIb}\beta_3$) | | |
| Serotonina | • G α_q | | | | | |
| Vasopresina | • G $\alpha_{12/13}$ | | | | | |
| Complejos inmunes | • G ₁ y G _s | | | | | |
| Plasmina | | | | | | |
| Flujo | | | | | | |

Col, colágeno; Tr, trombina; TxA₂, tromboxano A₂; ADP, difosfato de adenosina; Fb, fibrinógeno; TPS, trombospondina; vWF, factor de von Willebrand; GPIb-IX, glicoproteína Ib-IX; ITAM, inmunorreceptor basado en la activación de tirosina; GPVI, glicoproteína VI; CLEC-2, receptor de lectina de tipo C2; PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos; DAMPs, patrones moleculares asociados a daños; G α_q , G $\alpha_{12/13}$, G₁ y G_s, proteínas heterotriméricas G; PKB (Akt), proteína quinasa B; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; $\alpha_{IIb}\beta_3$, glicoproteína IIb-IIIa; ITIM, motivo inhibitorio dentro del inmunorreceptor de tirosina; ESAM, molécula de adhesión selectiva de células endoteliales; PI₃K, fosfatidil inositol-3 quinasa.

1.2.4.1.3.2. Expresión de la actividad procoagulante y formación de micropartículas

Podemos concluir que las plaquetas activadas constituyen los elementos básicos del trombo hemostático y proporcionan una superficie que permite la asociación de complejos enzimáticos responsables de la generación de Tr. El complejo enzimático que convierte la protrombina en Tr,

Introducción

designado como protrombina, está compuesto por el factor V activado (Va), el factor X activado (Xa), iones Ca^{2+} y protrombina; estos agentes interactúan en la superficie de vesículas lipídicas que contienen fosfolípidos aniónicos. La actividad procoagulante de las plaquetas activadas, inicialmente designada como factor plaquetario 3 (PF3), es debida a la exposición de fosfolípidos aniónicos en la capa externa de la membrana, especialmente la fosfatidilserina, permitiendo la asociación de los componentes del complejo protrombina. A su vez, la estimulación de las plaquetas por agonistas fisiológicos, como el Col o la Tr, determina la pérdida de esta asimetría y la exposición de fosfatidilserina (FS) en la capa externa, proceso que es acompañado por el desprendimiento de micropartículas membranales de la superficie (MPs). La asimetría de los fosfolípidos está regulada por las actividades cooperativas de tres transportadores: la *translocasa* de aminofosfolípidos dependiente de ATP, la cual rápidamente transporta FS y fosfatidiletanolamida (PE) de la capa externa hacia la capa interna, la *flipasa lipídica* inespecífica dependiente de ATP, la cual transporta lípidos de la capa interna a la capa externa y la *escramblasa* lipídica no específica, dependiente de Ca^{2+} , la cual permite que los lípidos se muevan al azar entre las dos capas (Owens *et al.*, 2011).

La concentración de Ca^{2+} intracelular fisiológica, promueve la asimetría de FS porque la *translocasa* y la *flipasa* son activas, pero la *escramblasa* es inactiva. Tras la activación celular, el incremento de Ca^{2+} intracelular induce una distribución al azar de los PL en la membrana, ya que inhibe la *translocasa* y estimula la actividad *escramblasa*; a su vez, puede también resultar en la activación de la calpaína, lo cual facilita el burbujeo (blebbing) de la membrana y la liberación de las MPs que expresan FS. El desprendimiento de las MPs está relacionado con la disrupción del citoesqueleto de la membrana plaquetaria y la disrupción de la asociación de los filamentos de actina con la superficie de la membrana, llegándose a la conclusión que contienen la mayor parte de la actividad atribuida a las plaquetas (Nagata *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha hallado que las MPs derivadas de los monocitos también estimulan la coagulación a través de la vía intrínseca y extrínseca, sugiriendo que las MPs de diferente origen parecen activar la coagulación a través de ambas vías, pudiendo constituir un principio general de MP dependiente del sistema de activación de la coagulación. Por lo tanto, la focalización en la formación o función de los MPs podría ser un posible blanco a futuro, para dilucidar la coagulación disfuncional en la sepsis, ya que la interferencia de las vías de la coagulación, tanto intrínseca como extrínseca, sólo

pueden inhibir parcialmente la activación del sistema de coagulación inducida por MP (Oehmcke *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que las MPs tienen la capacidad de desencadenar la formación de Tr y que este efecto es dependiente de la expresión de FS y mediada a través de la vía intrínseca y extrínseca de la coagulación. Por lo tanto, se sugiere que el objetivo de la función plaquetaria y/o la formación de MP podría ser una forma útil de protección contra la coagulación disfuncional en infecciones graves (Wang *et al.*, 2017).

1.2.4.2. Proteínas plaquetarias

La naturaleza anucleada de las plaquetas convierte a la proteómica en una valiosa herramienta para ayudar y comprender mejor los procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con la hemostasia y la trombosis. En varios estudios proteómicos, como en el trabajo de Burkhart *et al.* (2012), se han identificado 2000 proteínas y más de 1000 proteínas plaquetarias con modificación post-translacional. En el año 2005, Martens *et al.* identificaron la Gal-1 (P09382) por análisis de HPLC-MS/MS como una proteína de muy baja concentración plaquetaria.

Estado actual de la proteómica plaquetaria. El proteoma puede describirse como el conjunto completo de proteínas expresadas dentro de una muestra definida bajo distintas condiciones. Por lo tanto, estos estudios han mejorado significativamente el conocimiento de la composición cuantitativa de las plaquetas y la varianza biológica, demostrando que la proteómica cuantitativa es una poderosa herramienta para realizar estudios y relacionarlos con la patología, utilizando tan sólo un pequeño volumen de sangre periférica (Burkhart *et al.*, 2014).

Estudios recientes demostraron que usando la tecnología proteómica moderna se pueden detectar ≈ 10.000 proteínas en líneas celulares humanas, cubriendo un rango dinámico de 7 órdenes de magnitud. Más de 300 proteínas modificadas post-translacionalmente (PTM) considerablemente conocidas multiplican esta complejidad (Zahedi *et al.*, 2013).

Hacia fines de la década de 1970, la introducción de la electroforesis en gel bidimensional (2-DE) facilitó el camino para resolver y comparar patrones de proteínas de muestras complejas, pero no fue hasta el desarrollo de espectrometría de masas (MS) basada en estrategias proteómicas que los puntos del gel de interés podían estar conectados a proteínas identificables. Por lo tanto, la mayoría de

Introducción

las limitaciones mencionadas de la 2-DE son superadas con el advenimiento de avanzadas técnicas proteómicas libres de gel. Aunque varias de estas técnicas basadas en MS se han utilizado para profundizar la comprensión sobre las plaquetas humanas (**Fig. 1.32**), sólo se estaría comenzando a explotar el abanico de posibilidades, más allá de la mera identificación de las proteínas más abundantes. Dependiendo del diseño de estudio, a partir del análisis del proteoma plaquetario puede obtenerse diferente tipo de información (**Fig. 1.32**). La proteómica puede proporcionar información (cuantitativa) de las plaquetas, de sus subcompartimentos (por ejemplo, la membrana plasmática) o derivados de micropartículas de plaquetas, examinadas en condiciones de reposo o activadas. Además, la proteómica puede proporcionar información cuantitativa sobre los cambios en los niveles de la proteína y de PTM, por ejemplo, en la perturbación del estado de reposo (luego del tratamiento con un agonista) o cuando comparamos las plaquetas derivadas de diferentes donantes (antecedentes genómicos o sanos vs. enfermos) (Burkhart *et al.*, 2014).

En consecuencia, los estudios proteómicos de plaquetas no sólo pueden contribuir a revelar los mecanismos funcionales, sino que también ayudan a identificar las proteínas *target* que se asocian con la génesis o progresión de una condición patológica. Tales estudios, por lo tanto, prometen proporcionar biomarcadores potenciales para la prevalencia de enfermedades. Pero por ahora los biomarcadores derivados de la proteómica son escasos. Sin embargo, el constante y rápido progreso de las tecnologías de proteómica en los últimos años ha abierto un camino a la aplicación en investigación clínica y posee un gran potencial hacia el futuro. Es un gran desafío encontrar biomarcadores, debido a que todavía sigue siendo afectada su búsqueda por interferencias en la etapa preanalítica. Dichas interferencias generalmente son causadas por impurezas o por la preactivación, siendo los biomarcadores plaquetarios conocidos influenciados por los protocolos de aislamiento de plaquetas. Por lo tanto, para eludir resultados artificiales, existe la necesidad urgente de estandarizar los protocolos de preparación y activación de plaquetas, así como también del aislamiento de proteínas (Wrzyszc *et al.*, 2017).

Introducción

otros enfoques. La sigla COFRADIC indica cromatografía fraccional combinada; y MudPIT, tecnología multidimensional de identificación de proteínas (**Fig. 1.33.B**) (Burkhart *et al.*, 2014).

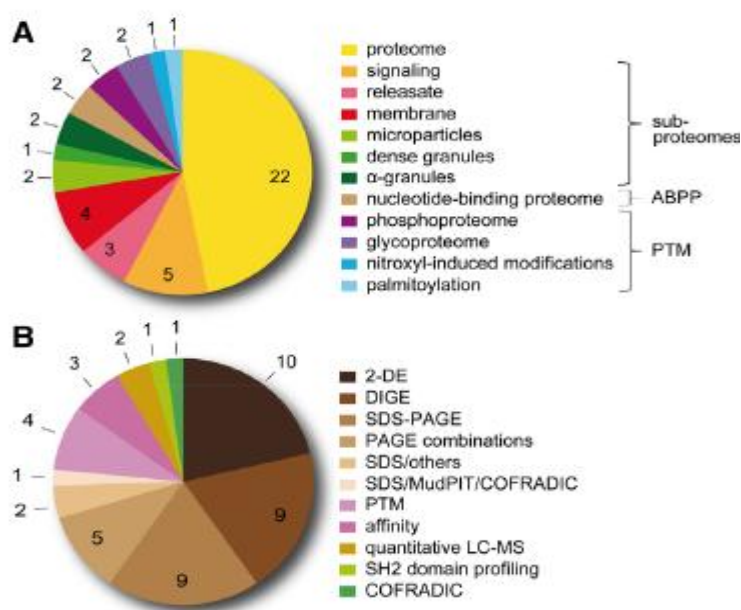


Figura 1.33. Resumen de 47 estudios de proteómica plaquetaria. Tomado de Burkhart *et al.*, 2014. **A.** La proteómica plaquetaria se ha utilizado para caracterizar el proteoma global, subproteomas específicos y el perfil de proteínas basado en la actividad (ABPP), y modificaciones post-traduccionales (PTM). **B.** Los estudios son principalmente (40%) sobre la base de electroforesis en gel bidimensional (2-DE)/ electroforesis en gel diferencial (DIGE), mientras que libre de gel (23%) todavía están sub-representados. La combinación se refiere a estudios que usan 2-DE/ DIGE en la combinación con otros enfoques. COFRADIC indica cromatografía fraccional combinada; y MudPIT, Tecnología multidimensional de identificación de proteínas.

Actualmente se han clasificado las proteínas presentes en plaquetas humanas en tres grupos según el número de copias acumuladas: top-100, top-200 y top-500. Las top-100 engloban a las 100 proteínas más abundantes, todas abarcan 11.606k números de copias (cada una tiene > 35k copias por plaqueta); en este grupo se le puede atribuir más de la mitad de todas las copias a la actina-miosina y al citoesqueleto de microtúbulos, siendo la más prominente la β -actina (795k copias) y la α -tubulina (185k copias). Esto podría ser una consecuencia de la alta relación superficie-volumen plaquetaria (y, por lo tanto, el gran contenido del citoesqueleto) en comparación con las células nucleadas más grandes. Dentro de este grupo, algunas son α -granulares (16%), entre ellas, el factor plaquetario-4 (CXCL4, 706k) y la β -tromboglobulina (CXCL7, 479k) y TPS-1 (101k) se encuentran en alta concentración. Estas proteínas se liberan durante la activación plaquetaria y pueden depositarse en la pared del vaso dañado. La proteína CXCL4 actúa como un quimioatrayente para los leucocitos y células vasculares, así como también para bacterias, permitiendo su reconocimiento por los anticuerpos circulantes y su destrucción. Otras proteínas altamente expresadas en los α -gránulos son el Fb (89k), la

Introducción

transglutaminasa y el factor de coagulación XIII (83k); este último tiene un papel importante en la formación de coágulos de fibrina en las plaquetas (Burkhart *et al.*, 2014).

Las proteínas que pueden clasificarse como proteínas de señalización ligadas al citoesqueleto (9%) tienen también un interés particular. Entre ellas se destacan la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, la Ta (116k), el miembro de fermitina URP2 (116k), la filamina A (FA, 88k) y la vinculina (81k). El citoesqueleto está relacionado con la actina a través del complejo GPIb-V-IX (receptores del vWF), son las denominadas proteínas 14-3-3 adaptadoras o modificadoras, de las cuales 5 miembros de ellas parecen estar muy expresadas (su suma es de 572k). El citoesqueleto también desempeña un papel importante en la regulación de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ y la GPIb-V-IX, siendo dos receptores adhesivos clave, y los datos de la proteómica han reconocido esto, revelando remanentes del citoesqueleto de actina conectados a estos receptores. Además, tanto la $\alpha_{IIb}\beta_3$ (64k-83k) como la GPIb-V-IX (49k) están presentes entre las 100 proteínas plaquetarias top, proporcionando así suficiente número de copias para modular la actividad de las plaquetas dependiente del citoesqueleto (Burkhart *et al.*, 2014).

Curiosamente, la proteína de membrana altamente expresada es el canal de cloruro CLIC1 (44k), cuya función aún es poco conocida pero se sabe que puede incluir la modulación de la señalización del receptor de ADP. Entre las proteínas citosólicas más profusamente expresadas se encuentran las pequeñas proteínas de unión a GTP y sus reguladores, en particular las dos variantes de Rap1b (299k) y RapA (125k), que regulan la activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en una vía dependiente del citoesqueleto. Otras proteínas pequeñas de unión a GTP abundantes son los dos factores de ribosilación de ADP (80k) y Rab27b (36k), de los cuales al menos este último controla la secreción de gránulos densos plaquetarios. Directamente o indirectamente ligado a la señalización de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ dependiente de actina se encuentra también la proteína adaptadora, VASP (45k), y la integrina vinculada a quinasa (60k). Lo mismo ocurre con la proteasa dependiente de Ca^{2+} Calpaina-1 (51k), que escinde muchos componentes del citoesqueleto y controla el cierre de la integrina en plaquetas procoagulantes (Mattheij *et al.*, 2013).

Otro hecho notable es que dos de las proteínas de señalización altamente expresadas desempeñan un papel en la inhibición de plaquetas dependiente de la PKA, es decir, la proteína asociada a adenilil ciclasa CAP1 (42k) y VASP, la cual es el principal sustrato de este quinasa dependiente de cAMP (Burgers *et al.*, 2012).

Introducción

A su vez, la mayoría de las 100 proteínas que controlan los procesos metabólicos están confinadas al metabolismo de la glucosa (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fructosa bisfosfato aldolasa, α/γ -enolasa, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglicerato quinasa; cada una entre 36k-106k). Por lo tanto, la glicólisis parece ser la vía esencial para el control metabólico de la funcionalidad plaquetaria (Fidler *et al.*, 2017).

Al comparar las categorías de las proteínas top-100 con las de los primeros 200 (13.929k copias, > 16k por proteína) y las proteínas top-500 (16.943k copias, > 6,7k por proteína), podemos mencionar varios cambios (**Fig. 1.34**) (Burkhart *et al.*, 2014).

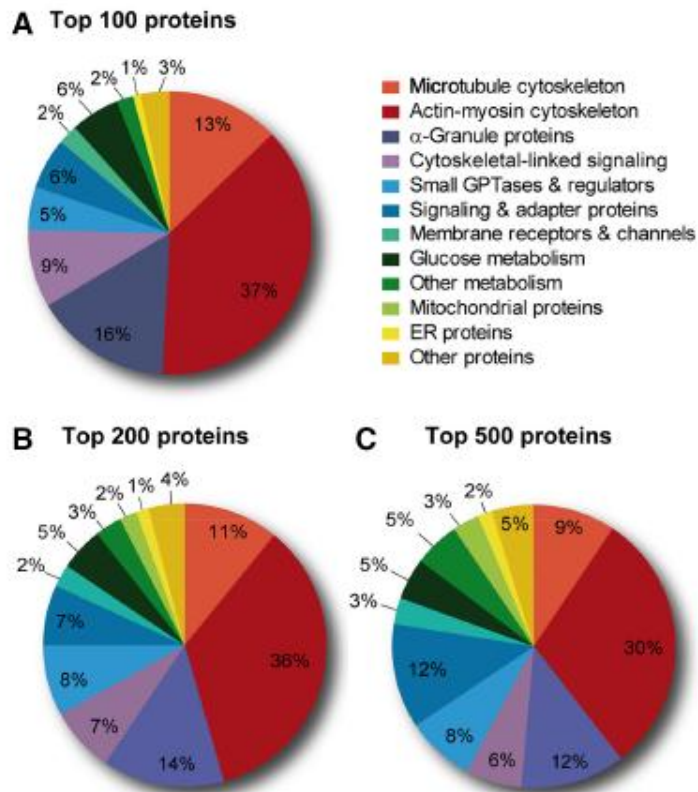


Figura 1.34. Distribución de acuerdo a las categorías funcionales, de las 500 proteínas más abundantemente expresadas.

Observamos en el gráfico que top-100 (A), top-200 (B), y top-500 (C) son las proteínas más abundantes en plaquetas humanas, determinadas por el análisis de proteómica cuantitativa.

Las proteínas top-100 tienen un número estimado > 35k copias por plaquetas, las top-200 > 16k copias por plaquetas, y las top-500 > 6.7k copias por plaquetas.

ER indica retículo endoplásmico. Tomado de Burkhart *et al.*, 2014.

Los conjuntos de proteínas top-200 y top-500 muestran una pequeña disminución en la abundancia relativa de proteínas como la actina y la miosina de los microtúbulos y las citoesqueléticas, así como en las proteínas de los gránulos α , lo que indicaría que estas proteínas se expresarían con un alto número de copias. Lo mismo ocurre para la categoría de proteínas de señalización ligadas al citoesqueleto (Burkhart *et al.*, 2014).

Introducción

En contraste, hay un aumento en la abundancia de pequeñas GTPasas y sus reguladores (5% - 8%), con importantes contribuciones de los reguladores de las isoformas Cdc42, Rab, Rac y Rho, que organizan interacciones de la membrana intracelular y el cambio de forma de las plaquetas. Además, las proteínas top 500 comprenden un marcado aumento del número de copias de proteínas de señalización y adaptadoras (6%-12%). Estas incluyen un número significativo de proteínas adaptadoras mal definidas; varias proteínas del sistema proteasoma-ubiquitina (suma > 80k), bien conocidas (Src, Btk, Lyn) y proteína quinasas de tirosina menos conocidas, varias proteínas quinasas seronina/treonina (proteína quinasa C α , PKA, ROCK, isoformas MAPK); proteína fosfatasas (G6b, PP1-3 isoformas), proteínas de unión a Ca²⁺ y unión clásica de las proteínas G α q y G α i al GTP y componentes del complejo TxA sintasa. Las proteínas receptoras de membrana pertenecientes al grupo top-500 incluyen varios antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase HLA, el receptor de colágeno GPVI, la tetraspanina CD9 y el receptor de trombospondina CD36. En conjunto, la mayoría de estas proteínas forman parte de la señalización, control de la activación plaquetaria para la adhesión y secreción; el agregado top-500 muestra además un desplazamiento de las proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa a las del metabolismo de la no glucosa (2% -5%). Esta última categoría contiene, por ejemplo, las enzimas antioxidantes que intervienen en la conversión de nucleótidos en glutatión. Las proteínas prominentes del retículo endoplásmico (2% de los top-500) son proteínas isomerasas disulfuro (suma 34k) e isoformas del tipo SERCA (bomba de calcio de retículo sarcoplásmico), que intervienen en la regulación de la homeostasis del calcio (suma 25k). En las mitocondrias (3%), estos incluyen ATP sintasa (28k) junto con otras proteínas implicadas en la síntesis de ATP. Sorprendentemente, la lista de los primeros 500 contiene apenas proteínas que controlan el desarrollo de megacariocitos y de formación de proplaquetas por un lado, o la apoptosis plaquetaria por otro. Por lo tanto, se puede concluir que esta lista, obtenida por proteómica cuantitativa, proporciona una mejor comprensión de las funciones de las plaquetas durante la hemostasia y la trombosis, aunque el papel de muchas de las proteínas de la lista aún no se comprende. Considerando que la abundancia refleja la importancia de las proteínas estructurales, debe tenerse en cuenta que la abundancia de las proteínas reguladoras no necesariamente se correlaciona con su importancia (Burkhart *et al.*, 2014).

1.2.5. Actividades biológicas mediadas por plaquetas

Las plaquetas son células altamente especializadas anucleadas responsables de la hemostasia y a su vez nos defienden contra los microorganismos patógenos. Actualmente, las plaquetas han sido identificadas como células centinelas inmunes ubicuas que favorecen la iniciación y la propagación de la inflamación y son cruciales participantes en la defensa exitosa del anfitrión. Debido a su función proinflamatoria, las plaquetas están implicadas en la patogénesis de varias enfermedades, tales como aterosclerosis, artritis, vasculitis, glomerulonefritis, sepsis, neuroinflamación, enfermedades inflamatorias intestinales y cáncer, entre otras (Mancuso & Santagostino, 2017).

1.2.5.1. Actividades biológicas *funcionales* mediadas por las plaquetas

1.2.5.1.1. Hemostasia

Como hemos descrito previamente en este capítulo, la función básica de las plaquetas es reparar los vasos dañados, agregándose y evitando el sangrado, favoreciendo la reparación del tejido endotelial (Ho-Tin-Noe *et al.*, 2011).

Se produce un cierre temporal, que luego continúa con la formación del trombo, lo cual contribuye a la cicatrización y regeneración celular. Sin embargo, si la activación de las plaquetas no tiene una adecuada regulación, pueden desencadenarse serias patologías, tales como infarto de miocardio o enfermedad cerebrovascular (stroke). La formación de trombos se produce inicialmente por el contacto de las plaquetas con la matriz subendotelial luego de la injuria del vaso, seguida por la adhesión, el spreading y la agregación. El primer punto de contacto es entre la glicoproteína GPIb-V-IX y el vWF, seguido por la interacción entre la glicoproteína GPVI y el Col, que activa proteínas de adhesión adicionales tales como GPIIb-IIIa (mediadora de la adhesión irreversible con el vWF) y la GPIa-IIa (segundo receptor del Col) (Mancuso & Santagostino, 2017).

Posteriormente la señalización mediada de *adentro hacia afuera* produce la activación plaquetaria con cambio de forma y formación de filopodios, los cuales permiten una mayor eficacia para cubrir la superficie vascular injuriada y finalmente se produce la degranulación. La degranulation libera los granulos α y densos, los cuales contienen los mediadores secundarios, tales como TxA_2 y ADP, manteniendo la iniciación y amplificación luego de la agregación plaquetaria a través del Fb mediando las interacciones entre los receptores activados y la membrana plaquetaria. Los sucesivos

ciclos de activación plaquetaria, adherencia, spreading, migración, agregación y estabilización forman un trombo que se compone de la fibrina y las células sanguíneas retenidas dentro de la red. El reclutamiento de los fibroblastos y de las células inmunes a través de las plaquetas inicia mecanismos angiogénicos que estimulan el efecto de glicosaminoglicanos tales como CXCL4, que presentan alta afinidad luego de contactarse entre las células endoteliales y las plaquetas. La alta afinidad del CXCL4 cargado negativamente, puede afectar la relación entre la heparina y los glicosaminoglicanos, iniciando exitosamente la interacción entre los complejos de heparina y los tetrámeros de CXCL4 que pueden llevar a la activación y agrupación del receptor de plaquetas Fc α RIIa, incrementando el riesgo de trombosis venosa y arterial en el marco del síndrome referido a la trombocitopenia inducida por heparina. En estas condiciones se reduce el recuento plaquetario, tanto por el secuestro intravascular como por la activación seguida de la fagocitosis por el sistema reticuloendotelial (Sandset *et al.*, 2012).

Las células endoteliales y las plaquetas se relacionan para mantener la hemostasia, preservando la integridad vascular por sus estrictas interacciones entre la membrana y la liberación de células tropógenas endoteliales. Existen evidencias clínicas que la interrupción de la interacción normal entre las plaquetas y las células endoteliales, como consecuencia de la pérdida de la red intercelular en pacientes con severa trombocitopenia, produce la extravasación de las células sanguíneas (Nachman & Raffi, 2008).

1.2.5.1.2. Modulación inmune producida por las plaquetas

Puede considerarse que las plaquetas forman parte de la inmunidad innata, debido a que interaccionan con los leucocitos y el sistema de complemento. Se sabe que el sistema de complemento y las plaquetas interaccionan en diferentes niveles, debido a que varios receptores y factores del complemento pueden ser detectados en la superficie plaquetaria y a su vez, las plaquetas activadas por Tr pueden desencadenar la cascada del complemento (Hamad *et al.*, 2010).

La interacción entre las plaquetas y el sistema de complemento es evidenciada en algunas enfermedades, como en el síndrome urémico hemolítico, la trombosis microvascular, la anemia hemolítica trombocitopenia y la falla multiorgánica (Noris & Remuzzi, 2009).

La función de las plaquetas en la inmunidad está altamente relacionada con la expresión del receptor Fc α RIIa, el cual tiene una baja afinidad por la región constante Fc de la inmunoglobulina G (IgG) que reconoce el complejo inmune y contrariamente tiene una alta afinidad por las células

Introducción

opsonizadoras de IgG. En leucocitos, el Fc γ RIIa inicia funciones efectoras fuertes que son claves para la respuesta inflamatoria e inmune. Los neutrófilos son susceptibles a la visualización de este receptor cuando existe una alta densidad de plaquetas, por lo que gracias a ellas es posible que interactúen con la IgG soluble y de esta manera medien la activación plaquetaria que podría ser en respuesta, por ejemplo, a la IgG opsonizada por un patógeno. Luego, el Fc γ RIIa rápidamente produce la interacción con la tirosina fosforilada, la cual activa a la PLC β 2 que induce la producción de segundos mensajeros produciendo el incremento del Ca²⁺ intracelular y la activación de la PKC, esencial para la secreción y agregación plaquetaria. Por lo tanto, el Fc γ RIIa puede funcionar como un amplificador de la activación plaquetaria, incluso en ausencia de un estímulo extracelular específico. Existen varias infecciones virales de causa severa que incluso bajo tratamiento pueden producir sangrado debido al dramático descenso en el número de plaquetas. Por lo tanto, la trombocitopenia puede deberse a la destrucción de las plaquetas por la unión a IgG o por agregación a los leucocitos (Chen *et al.*, 2017b).

Además, las plaquetas pueden unirse e internalizar los agentes infecciosos a través de varios receptores que se encuentran en la membrana plaquetaria. Sin embargo, las interacciones plaqueta-virus pueden tener un papel ambivalente: de hecho, las plaquetas *in vivo* pueden contribuir a la diseminación de la infección, así como a la defensa del anfitrión. Las plaquetas humanas además cumplen funciones específicas en las infecciones bacterianas debido a que contienen una serie de proteínas antibacterianas, denominadas *trombocidinas*, en sus gránulos α , que se liberan tras la activación. Son variantes truncadas de las quimiocinas CXCL7, CXCL4 y CCL5 plaquetarias y muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo muy potentes contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (Garraud *et al.*, 2017).

Por otro lado, las bacterias pueden inducir la activación plaquetaria por interacciones indirectas con receptores específicos. *Staphylococcus aureus* activa rápidamente las plaquetas a través de la interacción entre la proteína de unión Fn bacteriana A y la $\alpha_{IIb}\beta_3$ sobre las plaquetas, a través de los puentes Fb/Fn, así como a través de una IgG específica que se une a Fc γ RIIa, traduciendo la señal de activación final. Además, la superficie de las plaquetas muestra una serie de receptores TLR, de los cuales TLR4 es el más abundante y cuya expresión podría ser modulada por el estado de activación plaquetaria. Un ejemplo de dicho proceso se ha encontrado estudiando la enfermedad de Crohn (CD) donde se observó que el receptor TLR4, podría estar implicado en *crosstalks* entre plaquetas y leucocitos conduciendo a su mutua activación para la defensa del huésped. Se ha evidenciado que la

Introducción

participación de la TLR-4 de plaquetas mejoraría la secreción de péptidos antimicrobianos de neutrófilos. Mientras que la agregación plaquetaria puede ser debida a una variedad de mecanismos en la enfermedad inflamatoria, la activación mutua de plaquetas y neutrófilos puede aumentar la defensa del huésped (Schmid *et al.*, 2017).

Las plaquetas también expresan sensores de patógenos, siendo inmunoglobulinas o receptores del complemento, que conducen a su activación tras la interacción con componentes bacterianos. Estos sensores, los PARs, principalmente detectan señales de peligro a través de patrones moleculares, que incluyen moléculas que pertenecen a la familia Siglec. A su vez, las plaquetas activadas son capaces de activar neutrófilos, que liberan ADN en forma de trampas extracelulares llamadas NET, que a su vez se unen e inactivan a las bacterias (Clark *et al.*, 2007).

Además, la interacción entre el complemento C3 y GPIb presenta un efecto fuerte de potenciación sobre la respuesta inmune a infecciones bacterianas *in vivo*. Con respecto a la participación plaquetaria en la inflamación o lesión vascular, las mismas se adhieren al endotelio y/o al espacio sub-endotelial, reclutando las células inflamatorias, orquestando así la respuesta inflamatoria. Las células inflamatorias, como neutrófilos o monocitos, pueden interactuar con plaquetas que median su adhesión a la pared del vaso. Las interacciones adhesivas entre leucocitos y plaquetas incluyen la unión entre: (1) la P-selectina sobre plaquetas al ligando de glicoproteína-1 de selectina P (PSGL-1) sobre leucocitos; (2) GPIb o molécula de adhesión funcional-C (JAM-3) sobre las plaquetas y β_2 -integrina Mac-1 sobre leucocitos, este último principalmente bajo condiciones de bajo esfuerzo cortante; (3) Fb unido a $\alpha_{IIb}\beta_3$ en plaquetas y β_2 -integrina Mac-1 en leucocitos (Ghasemzadeh *et al.*, 2013).

Además de mediar el reclutamiento de células inflamatorias, las plaquetas son una fuente importante de quimiocinas pro-inflamatorias y citocinas que pueden también promover la inflamación por la liberación de micropartículas (Vasina *et al.*, 2010).

Actualmente se ha dilucidado la existencia de subclases de gránulos α altamente compartimentados y morfológicamente diferentes que contienen subconjuntos específicos de quimiocinas que también son liberadas en condiciones fisiológicas y patológicas (van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2010).

Recordamos que las quimiocinas son citocinas quimiotácticas clasificadas en cuatro familias de acuerdo con las disposiciones de los residuos de cisteína, las cuales participan en la formación de los

puentes disulfuro (es decir, CXCL, CC, CX3C, XC). Las quimiocinas derivadas de plaquetas más abundantes son CXCL4 (también conocidas como PF4) y CXCL7 que se identifican como marcadores para el linaje megacariocítico; además de estos, hay muchas otras quimiocinas expresadas y liberadas por plaquetas (CCL5, MIF, CXCL12, CXCL5), pero que han sido principalmente identificadas en otros tipos de células (Mancuso & Santagostino, 2017).

Por otro lado, las plaquetas son capaces de inducir la respuesta de fase aguda principalmente debido a su capacidad para producir IL1 β , que no es una molécula almacenada en los gránulos, pero que se sintetiza a partir de un pre-mensajero ARN presente en su citoplasma (Lindemann *et al*, 2001).

Las plaquetas constitutivamente expresan componentes de la inflamación severa, tanto en la inflamación estéril como infecciosa. Tras la activación, las plaquetas sintetizan, procesan y secretan IL1 β , que se encuentra en los trombos oclusivos pocas horas después de producirse el daño en la pared vascular. A su vez, la IL1 β se secreta principalmente en las micropartículas y su acumulación en los trombos estériles precede a la incorporación de leucocitos en el coágulo, aliando de esta manera la coagulación con la inflamación endotelial local. Además, la IL1 β activa su propia síntesis en las plaquetas debido a la presencia de IL1R en las superficies de plaquetas y megacariocitos, creando un bucle autócrino (Brown *et al.*, 2013).

1.2.5.2. Actividades biológicas en *procesos patológicos*

Debido a su papel proinflamatorio, las plaquetas están implicadas en la patogénesis de varias enfermedades, incluyendo aterosclerosis, artritis, vasculitis, glomerulonefritis, sepsis, neuroinflamación y enfermedades inflamatorias intestinales, entre otras (Langer *et al.*, 2012).

La microvasculatura cerebral difiere significativamente de los otros lechos vasculares; respecto a la neuroinflamación, las plaquetas juegan una función relevante, junto a las células endoteliales y a las células de la microglía, debido a que participan en la inflamación cerebral inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF). El agotamiento de las plaquetas reduce el rodamiento leucocitario y su adherencia al endotelio cerebral durante la inflamación inducida por TNF (Carvalho-Tavares *et al*, 2000).

Por otro lado, algunos estudios *in vitro* y experimentos con modelos animales demostraron que las plaquetas pueden estimular y expresar un perfil pro-inflamatorio, liberando varias citocinas en las células endoteliales del cerebro en el curso del paludismo cerebral (Barbier *et al.*, 2011).

Introducción

De manera similar, la interacción entre las plaquetas, los leucocitos y el endotelio cerebral pueden modular el curso de las enfermedades neuroinflamatorias, tales como apoplejía (sangrado de un órgano), enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple (EM). Un denominador común entre estas enfermedades es el plegamiento de proteínas, que puede inducir la agregación plaquetaria con expresión posterior de receptores activados por proliferación del peroxisoma y la liberación de mediadores proinflamatorios de plaquetas (Li *et al.*, 2015).

Neoplasia y efectos sobre la coagulación. La presencia de plaquetas activadas por células tumorales en el torrente sanguíneo puede predisponer a los pacientes con cáncer a eventos trombóticos. La correlación entre el cáncer y el riesgo de tromboembolismo venoso (TEV), señalada por primera vez en 1865 por el Dr. Armand Trousseau, ha sido bien documentada (Varki, 2007).

Khorana *et al.*, (2007a y b) encontraron que los pacientes con cáncer tenían un alto riesgo de que produzcan un episodio de TEV, siendo la complicación más frecuente de los pacientes hospitalizados. Se determinó que la probabilidad de experimentar TEV era 47 veces mayor en los pacientes oncológicos que recibían quimioterapia. Por lo tanto, se llegó a la conclusión que el cáncer activo aumenta el riesgo de TEV entre cuatro y siete veces.

A su vez, los pacientes con cáncer que presentaron recuentos plaquetarios elevados antes de la quimioterapia, se asociaron significativamente con TEV, lo que indicaría que las plaquetas probablemente juegan un papel importante en el desarrollo de los eventos trombóticos. Por otro lado, se ha corroborado que los pacientes con cáncer de pulmón experimentan un riesgo elevado de tromboembolismo venoso, siendo un trastorno que empeora la calidad de vida y puede retrasar, interrumpir o detener completamente el tratamiento contra el cáncer, provocando el deceso del paciente (Kadlec *et al.*, 2014).

Las células tumorales estimulan la coagulación y la trombosis a través de múltiples mecanismos. El factor tisular producido por células tumorales y las MPs que derivan de ellas estimulan la cascada de coagulación, activando plaquetas y promoviendo la trombosis a través de la vía del factor tisular (extrínseca). Por otro lado, se encontró que el factor del tejido plasmático es predictivo de la TEV en el cáncer de páncreas. Las plaquetas activadas y los fosfolípidos negativamente cargados por células tumorales también pueden estimular la coagulación a través de la vía de activación por contacto (intrínseca) (Dicke & Langer, 2015).

Introducción

La IL-6 derivada de tumores y la trombopoyetina hepática también se asocia con trombocitosis y trombosis. Además, las MPs derivadas de tumores tienen una fuerte actividad procoagulante activando a las plaquetas e induciendo agregación y formación de trombos, acumulándose en el trombo al interactuar con la selectina P, demostrando el papel integral de las plaquetas en el desarrollo del TEV asociado al cáncer (Mege *et al.*, 2016).

La TEV y la trombocitosis son factores asociados a mal pronóstico de los pacientes con cáncer, destacando la necesidad de desarrollar un método para cuantificar el riesgo de TEV en dichos pacientes. Se ha llegado a la conclusión que podrían ser marcadores de la interacción célula tumoral-plaqueta la P-selectina, el factor tisular y las micropartículas para detectar signos tempranos de TEV, así como también los marcadores de inflamación (proteína C reactiva) y coagulación (D-dímero, Factor VIII) (Chadha *et al.*, 2015).

La detección temprana de los factores de riesgo asociados con TEV puede influir en el uso de la tromboprofilaxis y reducir sustancialmente la morbilidad y la mortalidad en pacientes con cáncer. Dado su papel crítico en el crecimiento del tumor, la metástasis y la trombosis asociada al cáncer, los marcadores de la actividad plaquetaria deben explorarse como biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas para la progresión del cáncer y TEV. Por lo tanto, las plaquetas juegan un papel crítico en la progresión y las metástasis del cáncer y contribuyen al desarrollo de TEV. Sin embargo, aún no está claro si la activación plaquetaria y la trombocitosis son en última instancia el agente causante o el resultado de la progresión tumoral. Además, todavía no se ha descrito el mecanismo molecular detrás de la coagulación inducida por plaquetas en el cáncer. A medida que la investigación avance utilizando biomarcadores de plaquetas en el diagnóstico, el pronóstico y el riesgo del cáncer, se podrá avanzar en el conocimiento de la dinámica plaquetaria relacionada con el cáncer (Meikle *et al.*, 2017).

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y Objetivos

Las galectinas son proteínas con secuencias de aminoácidos compartidas características y con afinidad por azúcares β -galactosídicos. La Gal-1 fue secuenciada en humanos a partir de diversos órganos y líneas celulares normales y neoplásicas; en nuestro laboratorio hemos purificado y secuenciado parcialmente la Gal-1 esplénica porcina, comprobando que tiene una homología de 80-90% con la Gal-1 de otras especies de mamíferos. Existen numerosas evidencias de que la Gal-1 estaría implicada en la modulación de la adhesión celular promoviéndola o inhibiéndola y/o en la estimulación o inhibición de la proliferación celular.

En cuanto a la detección de galectinas solubles en plasma humano, se ha observado la presencia de Gal-3 y su aumento en pacientes con cáncer gastrointestinal, de ovario, melanoma y linfoma no Hodgkin. Estos resultados sugerirían que la Gal-3 en circulación tendría un rol importante en la progresión del tumor. Por lo tanto existiría la posibilidad de poder usar la concentración de dicha galectina como predicción de futuras metástasis en estos pacientes. En la literatura existen datos sobre la presencia de Gal-1 en plasma humano a niveles muy bajos, por lo que su purificación y la posible formación de complejos con otras proteínas, tanto en plasma como en plaquetas humanas, sería un hallazgo relevante para entender su participación en procesos de interés clínico, tales como inflamación, trombosis y cáncer.

Se han descrito numerosos receptores para Gal-1 en diferentes células y los posibles mecanismos por los cuales las afecta. En relación a su participación en el proceso hemostático, algunos hallazgos podrían fundamentar esa posibilidad. Se ha observado la presencia de polimorfonucleares (PMN) en depósitos de fibrina *in vivo* que se unen específicamente a fibrina y pueden estar involucrados en la disolución del coágulo. El receptor de complemento 3 (CR3; CD11b/CD18) de PMN funciona como receptor del fragmento proteico de complemento (C3bi) y de Fb. La unión de ambos ligandos es inhibida por un péptido basado en la secuencia de residuos carboxilo terminal 397-411 de la cadena γ de Fb, indicando que el mismo sitio es usado por ambos. Esta es la misma región que es reconocida por el receptor de Fb de plaquetas, la GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$).

Por otro lado, hay otras lectinas de la familia de las selectinas, como la P-selectina que actúa como molécula de adhesión celular y está presente en las plaquetas y en las células endoteliales activadas y media la interacción con neutrófilos y monocitos. En la inflamación y en la trombosis, la P-selectina puede mediar la interacción de leucocitos con las plaquetas unidas en el lugar de injuria tisular y con las células endoteliales activadas. A su vez, la P-selectina que se expresa en las plaquetas activadas puede interactuar con receptores de la pared vascular, con L-selectina y con la proteína ligante de P-selectina PSGL-1 de linfocitos circulantes, permitiendo el *rolling* de los mismos por la pared de las vénulas y el reclutamiento a los nódulos periféricos aún en ausencia de L-

Hipótesis y Objetivos

selectina.

En la superficie de las plaquetas se ha demostrado la presencia de una molécula de adhesión como la ICAM-2 (ligando de β_2 -integrina) que puede jugar un rol importante en la interacción de leucocitos y plaquetas en la inflamación y en la trombosis. Por otra parte se sabe que receptores de Gal-1 descritos en otras células como CD107a y b, y algunos miembros de la familia de las integrinas, se encuentran presentes en plaquetas. Se ha demostrado que la Gal-1 interactúa con la subunidad β_1 de la integrina en células de músculo liso, que son un elemento clave en el desarrollo de la aterosclerosis y restenosis. A su vez, se observó que la Gal-1 modula, en forma dosis dependiente específica, la unión a β_1 -integrina de células de músculo liso. En forma paralela a nuestro trabajo, se describió que la Gal-1 juega un rol clave en la activación y en el funcionalismo plaquetario.

Se conoce que numerosas proteínas intervienen en el funcionalismo plaquetario; entre las proteínas que forman parte del citoesqueleto de la membrana se encuentra la Talina (Ta). Se ha demostrado que en plaquetas activadas con Tr, la Ta cambia su localización citoplasmática y se traslada a la membrana plasmática, interviniendo en la adhesión plaquetaria. En células de glioblastoma humano se ha descrito que la actina es un ligando de Gal-1. Por otra parte, se sabe que la unión de Ta a un dominio citoplasmático de integrina es crítica para inducir la activación de GPIIbIIIa por agonistas *in vivo* en plaquetas y que, a su vez, un pequeño porcentaje de GPIIbIIIa aparece asociado directamente con filamentos de actina mediando funciones de proteínas celulares. Asimismo, la Ta posee un dominio N-terminal FERM que une a la actina, por ello, nos proponemos investigar la interacción de Gal-1 con otras proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas.

Sin embargo, al momento de comenzar este Trabajo de Tesis, se desconocía la existencia de Gal-1 en plaquetas humanas. Por dicho motivo, nunca se había purificado la Gal-1 de plaquetas humanas y plasma y tampoco se había descrito ningún ligando de Gal-1 en las mismas.

Bajo este escenario, la **hipótesis** planteada en este Trabajo de Tesis fue la siguiente:

La Gal-1 se encuentra en plaquetas y en plasma humano e interacciona con receptores/ligandos de la plaqueta. A su vez, la Gal-1 endógena plaquetaria interacciona con proteínas que participan del funcionalismo plaquetario.

Hipótesis y Objetivos

El **objetivo general** propuesto fue el siguiente:

Debido a que la Gal-1 tiene un rol crucial en la homeostasis celular, inflamación y progresión tumoral, al igual que las plaquetas, y participa del funcionalismo plaquetario interaccionando a través de receptores/ligandos de la misma, nuestro objetivo general fue purificar y caracterizar a la Gal-1 plaquetaria y plasmática humana, así como también establecer las interacciones con proteínas que participan en el funcionamiento de dichas células.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: *Purificación y caracterización de Gal-1 en plaquetas humanas*

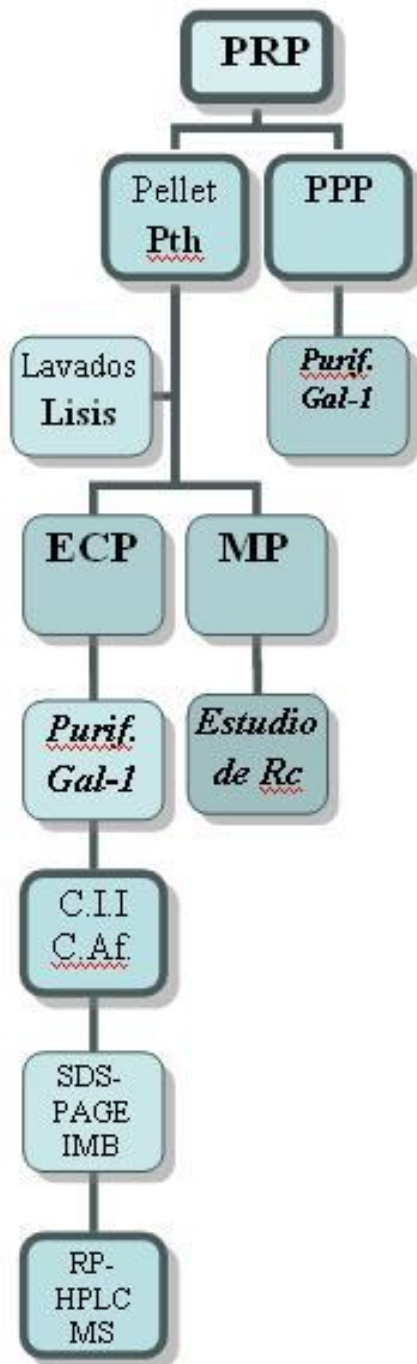
Objetivo 2: *Estudio de receptores/ligandos de Gal-1 en lisados de membrana de plaquetas humanas*

Objetivo 3: *Interacción de Gal-1 con proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas*

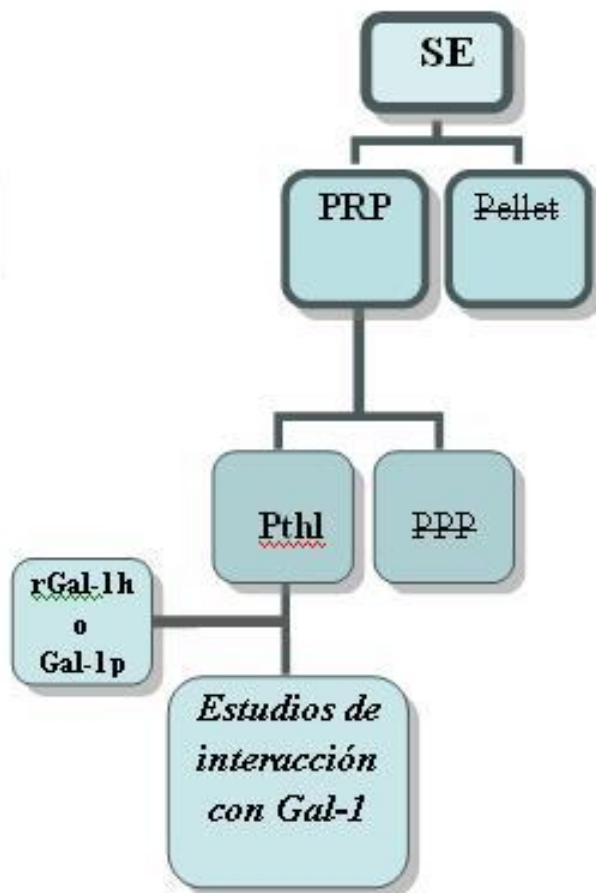
Objetivo 4: *Purificación y caracterización de Gal-1 en plasma humano*

3. Esquema de trabajo

Esquema de trabajo



Esquema 1:
Objetivos 1, 2 y 4



Esquema 2:
Objetivo 3

4. Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1. Obtención de Gal-1 recombinante humana (rGal-1h)

4.1.1. Transformación de bacterias competentes

4.1.1.1. Transformación por shock térmico

La expresión de rGal-1h se llevó a cabo incubando 100 μ l de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas por shock térmico con 1 μ l del plásmido pT7IML-1-LGALS1 (0.46 μ g/ml), conteniendo la secuencia codificante para Gal-1 humana, y el gen de resistencia a ampicilina, gentilmente donado por la Dra. Ma. Fernanda Troncoso (Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Biológica. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas Prof. Dr. Alejandro C. Paladini). Dicha incubación se realizó durante 30 min en hielo, seguida de 45 min a 42 °C y finalmente 2 min en hielo. Se recuperaron las células del shock, agregando 600 μ l de medio SOC, agitando posteriormente a 37 °C/1h. El medio SOC contiene peptona tripsica de caseína (Schärlau Microbiology) 20 g/l, extracto de levadura (Schärlau Microbiology) 5 g/l, NaCl (Panreac) 0,58 g/l, KCl (Merck) 0,19 g/l, MgCl₂ 2,03 g/l, MgSO₄ 2,46 g/l y glucosa (Panreac) 3,6 g/l.

4.1.1.2. Selección

Las bacterias transformadas se seleccionaron en presencia de ampicilina 100 μ g/ml en medio de cultivo LB suplementado con 15 g/l de agar para bacteriología (Schärlau Microbiology). El medio LB contiene peptona tripsica de caseína (Schärlau Microbiology) 10 g/l, extracto de levadura (Schärlau Microbiology) 5 g/l y NaCl (Panreac) 10 g/l. Las colonias obtenidas se incubaron en medio de cultivo LB durante toda la noche a 37 °C con agitación.

4.1.1.3. Precultivo o cultivo semilla

Se preparó en medio líquido, seleccionando de la placa una colonia de *Escherichia coli* transformada e incubándola en 5 ml de medio LB/Ampicilina líquido. Luego se trasvasó a un Erlenmeyer de 400 ml con agitación y se incubó a 37°C toda la noche.

4.1.1.4. Inducción

Se indujo la expresión de la lectina con el agregado de isopropil-tiogalactósido IPTG (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) en una concentración final de 0,1 mM durante 3 h a 37 °C con agitación, seguidos de 1 h a 28 °C para permitir el correcto plegado proteico. Previamente se

Materiales y Métodos

inoculó el precultivo al volumen total del medio de cultivo (400 ml), se incubó aprox. 4 h., se realizó una medida de Abs. a 600nm para establecer si el crecimiento del cultivo se encontraba en la fase exponencial. Luego se procedió a realizar la inducción, agregando IPTG (conc. final: 0.1 mM). Se constituyó un control negativo al cual no se le adicionó IPTG. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 4 h con agitación y cada hora se tomó 1 ml de medio con el fin de realizar la cinética de inducción. Cada alícuota se centrifugó a $13800 \times g$ por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis PBS/EDTA, preparado mediante la adición de 0.4 ml de EDTA 2 mM a 100 ml de PBS.

4.1.2. Extracción y purificación de rGal-1h del cultivo

4.1.2.1. Cosecha

El cultivo se cosechó mediante centrifugación a $3.500 \times g$ durante 20 min a 4 °C, en una centrífuga Sorvall, obteniendo el sobrenadante traslúcido. Se conservó el pellet, resuspendiéndolo en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, conteniendo ditiotretitol (DTT) 2 mM y fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 2 mM, debido a que si no se podía continuar el mismo día con el protocolo, se guardaba a 4 °C durante 24 h.

4.1.2.2. Sonicación

La suspensión celular obtenida como se describió en el ítem anterior, se sonicó utilizando 3 ciclos de 2 min con pulsos de 9.9 segundos y cinco segundos de descanso a temperatura de 4 °C, cada uno a un 20 % de la máxima potencia de un sonicador BRANSON Sonifier 450 (Branson Ultrasonics, Danbury, Estados Unidos). Luego se tomó una muestra de cada réplica de sonicado con un asa y se transfirió a una caja de Petri con medio, para determinar el crecimiento de colonias.

4.1.2.3 Centrifugación

El extracto bacteriano se clarificó mediante centrifugación a $26.000 \times g$ durante 45 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall.

4.1.3. Purificación

4.1.3.1. Separación cromatográfica

El sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de lactosa-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), aprovechando la propiedad de Gal-1 de unir β -galactósidos. La columna se equilibró con buffer MEPBS y la elución se llevó a cabo con MEPBS

conteniendo lactosa 100 mM. Las fracciones eluidas se concentraron por ultrafiltración utilizando filtros Amicon Ultra-15, con un tamaño de poro de 10.000 Da (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para alcanzar una concentración máxima de rGal-1h de 2 mg/ml.

4.1.3.2. Columna de polimixina

Los eluatos de la columna de afinidad se sembraron en columnas de polimixina, equilibradas con MEPBS-lactosa (100 mM). Una vez lavado el material no unido específicamente, se eluyeron y el contenido proteico de cada fracción eluida se midió por el método de Bradford (4.4.3.3).

4.2. Caracterización bioquímica parcial de la rGal-1h

4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se efectuó la electroforesis en geles de PAGE en condiciones desnaturalizantes, 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 la galectina en estudio.

Se utilizaron geles de un porcentaje de acrilamida de 12% y un espesor de 0,75 mm. Las muestras se desnaturalizaron 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 de 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 utilizó 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.

4.2.1.1. Tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue

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

4.2.1.2. Tinción de los geles con coloración argéntica

Se trata de una coloración mejorada para proteínas vegetales, ADN y ARN en geles de PAGE (Nesterenko *et al.*, 1994). 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.

Los geles se tratan con 100 ml de solución fijadora (metanol 50 ml, ácido acético 12 ml, formaldehído 37% 50 μ l, H_2O c.s.p. 100 ml) durante 1 hora o una noche para prevenir difusión de proteínas y disminuir el tono del fondo. Se lava tres veces (20 minutos cada una) con etanol 30% para remover el ácido acético y luego se sumerge en solución de pretratamiento ($S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ 0,03 g, H_2O desionizada c.s.p. 150 ml) 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 0,2 g, formaldehído 37% 75 μ l, H_2O desionizada csp 100 ml) durante 20 minutos y a continuación 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. Finalmente el gel se sumerge en la solución de desarrollo (Na_2CO_3 6 g, solución de pretratamiento 1 ml, formaldehído 37% 50 μ l, 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 y agua desionizada csp 100 ml, durante 10 minutos.

4.2.2. Inmunoblotting

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 μ m 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. con agitación. Se incubó con el primer anticuerpo anti Gal-1 [anti rGal-1h (1/1000) o anti Gal-1p (1/100)] obtenidas ambas en conejo en nuestro laboratorio, de acuerdo al protocolo del ensayo realizado, en PBS-Tween 20 durante 1 h a t.a. A sí mismo, en base a los resultados obtenidos secuencialmente en las purificaciones de la Gal-1, tanto

Materiales y Métodos

del extracto citosólico plaquetario como del PPP, debimos probar los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-haptoglobina (obtenido en conejos, Sigma) en una dilución 1:500, anticuerpo anti-albúmina humana (obtenido en conejos, Sigma) en una dilución 1:1000, anticuerpo anti-talina (obtenido en ratón, Sigma) en una dilución 1:200 y anticuerpo anti-actina (obtenido en conejo, Sigma) en una dilución 1:1000. 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. o con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (segundo anticuerpo, Sigma) en una dilución 1:3000 según correspondiera en base al primer anticuerpo utilizado. Finalmente, se realizaron tres lavados de 15 min cada uno en PBS y se desarrolló el color 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.

4.3. Obtención de anticuerpos policlonales antigalectina-1 recombinante humana (anti-rGal-1h)

Se prepararon sueros anti-rGal-1h en conejos New Zealand, previa obtención de las muestras de suero preinmune, de acuerdo a lo descrito para otra galectina (Elola & Fink, 1997). El antígeno se preparó emulsionando 300 µl de la lectina pura (conteniendo 100 µg de proteína) en un volumen igual de adyuvante completo de Freund y se inyectó por vía subcutánea. A la semana siguiente, igual cantidad de antígeno que la utilizada en la primera inyección se emulsionó en adyuvante incompleto de Freund y se inyectó por vía intramuscular. Se repitieron un total de alrededor de 20 inyecciones intramusculares más de 100 µg de lectina cada una y a intervalos de 7 días. Asimismo, se efectuaron sangrados periódicos, a los efectos de evaluar el antisuero por el método del immunoblotting o dotting.

La especificidad de los antisueros anti rGal-1h se estudiaron en immunoblotting siguiendo el método descrito por Elola y Fink (1997).

4.4. Purificación y caracterización de Gal-1 en plaquetas humanas

4.4.1. Preparación de plaquetas humanas lavadas (Pthl)

4.4.1.1. Plaquetas humanas sin leucodepleción

Se utilizaron bolsas de plasma rico en plaquetas (PRP) o concentrados de plaquetas donados por el Banco de Sangre, recolectándose unidades (50-100 ml cada una), con serología no reactiva

Materiales y Métodos

para: sífilis, Chagas, brucelosis, HCV, HBV, HTLV I/ II, HIV 1+2, conservadas a 22 °C, con agitación continua.

Por cada purificación realizada se procesaron de 20 a 30 bolsas de PRP, y una menor cantidad cuando se probaban cambios en los pasos o variables de la purificación, llevándose a cabo 18 purificaciones en total, durante este trabajo de investigación.

Se procedió a centrifugar el contenido de las bolsas a $560 \times g$ a 4 °C, durante 20 min, obteniendo el pellet de plaquetas y el plasma pobre en plaquetas (PPP). Al pellet de plaquetas se le agregó solución salina hipotónica (NH₄Cl 1%) 5 min a t.a. para eliminar el resto de glóbulos rojos. Luego se realizaron tres lavados con buffer Tris-HCl 0.01 M, EDTA 1 M, NaCl 0.15 M, glucosa 5 mM, PMSF 1 mM, pH 7.4; el tercer lavado sin EDTA. De esta manera se obtuvieron las plaquetas lavadas, llevándolas luego a una concentración de $5 \times 10^{11}/L$ (Kordich *et al.*, 2003), previo análisis de una alícuota en un contador automatizado Coulter.

4.4.1.2. Plaquetas humanas leucodeplecionadas

Se agregó al procedimiento descrito en 4.4.1.1 la filtración del PRP o concentrados de plaquetas con filtro de leucorreducción Nanjing Shuangwei Biotechnology & Co. Ltd. (de poliuretano altamente biocompatible, de alta eficacia, con una recuperación del 90-95% de plaquetas, una reducción de leucocitos del 99.9% y una media de leucocitos residuales inferior a 2×10^5 por concentrado de plaquetas o PRP).

La leucorreducción se realizó previo a la centrifugación; luego se procedió como se indica en el inciso 4.4.1.1. Se analizó una alícuota diluída 1/100 en un contador automatizado Coulter, como control de la leucodepleción realizada y para permitir los posibles cálculos posteriores.

4.4.1.3. Efecto del tiempo de almacenamiento plaquetario y otras variables

Se clasificaron las bolsas de PRP o concentrados plaquetarios de acuerdo al período comprendido desde su recolección hasta la llegada y el procesamiento de las mismas en el laboratorio, con la finalidad de evaluar la influencia de la edad plaquetaria en la purificación de la Gal-1. Se realizaron las purificaciones y caracterizaciones de las bolsas de PRP separándolas en cuatro grupos. El grupo I incluyó a las bolsas de PRP de 24 h, el grupo II a las bolsas de 24-48 h, el grupo III a las bolsas de 48-72 h y el grupo IV a las bolsas de entre 72 h y una semana. También se probaron tres buffers de lavado diferentes, dos preparados como describimos en el inciso 4.4.1.1, *buffer* TRIS-HCl a pH 7,4 con y sin agregado del inhibidor plaquetario prostaglandina E1 (PGE₁) y el tercero, *buffer* Tyrode (140mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,10mM NaHCO₃, 0,5 mM NaPO₄H₂, 1mM

MgCl₂, 22mM citrato de Na, 0,1% (W/V) Glu) a pH 6,5, con (PGE₁). A su vez, también se purificaron plaquetas irradiadas y no irradiadas filtradas.

4.4.2. Obtención del extracto citosólico plaquetario (ECP) y de las membranas

Se ensayaron dos formas de lisis plaquetaria: lisis de las membranas plaquetarias por congelamiento-descongelamiento y con un agente lisante. Se detallan a continuación.

4.4.2.1. Lisis de las membranas plaquetarias por congelamiento-descongelamiento

Las plaquetas lavadas fueron adicionadas con inhibidores de proteasas (PMSF, 0.075 g/L), E64 (1-10 μM) y pepstatina (1 μM)), luego se congelaron (-20 °C) y se descongelaron tres veces, procediendo a centrifugarlas en centrífuga PRESVAC refrigerada a 2000 × g a 4 °C durante 2 h, para separar el extracto citosólico de las membranas plaquetarias.

4.4.2.2. Lisis de las membranas plaquetarias con un agente lisante

Las plaquetas lavadas fueron adicionadas con inhibidores de proteasas [PMSF (0.075 g/L), E64 (1-10 μM) y pepstatina (1 μM)], se resuspendieron en TRIS-Glicina (pH 8.7)/Tritón 100 (1%), se homogeneizaron y se agitaron durante 30 min a 4 °C, luego se centrifugaron a 2000 × g a 4 °C durante 2 h, para separar el extracto citosólico de las membranas plaquetarias.

4.4.3. Purificación de la galectina plaquetaria

4.4.3.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico

El extracto citosólico plaquetario se procesó como fue descrito en el inciso 4.4.2. 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 fueron luego sometidas a cromatografía de afinidad (Ahmed *et al.*, 1994).

4.4.3.2. Cromatografía de afinidad

Los eluatos de DEAE-Sepharosa se sembraron en columnas de 50 ml de lactosa-agarosa, equilibradas con MEPBS 1:10-CINa 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 que se describe a continuación.

4.4.3.3. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

La concentración proteica de los extractos citosólicos crudos en los diferentes pasos de la purificación y de la galectina plaquetaria purificada, junto con los extractos de rGal-1, se determinaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Se utilizó reactivo comercial Biorad (**Tabla 4.I**) o reactivo propio puesto a punto utilizando el micrométodo de Bradford (**Tabla 4.II**).

El reactivo de Bradford propio se preparó disolviendo 100 mg de Coomasie 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 y se filtró antes de ser utilizado.

Los ensayos para determinar la concentración proteica de los extractos crudos y purificados de la Gal-1 plaquetaria, junto con los eluatos de rGal-1 de la columna de polimixina y la purificada, se realizaron incubando la muestra o la proteína estándar según las relaciones volumétricas y condiciones experimentales que se detallan en la Tabla 4.I o en la Tabla 4.II, para cinco diluciones de la albúmina y de la muestra de concentración desconocida. La absorbancia en cada tubo se leyó a 595 nm y las concentraciones desconocidas se calcularon utilizando la pendiente de la curva estándar según la siguiente relación:

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

Materiales y Métodos

Tabla 4.I. Protocolo para la determinación del contenido proteico utilizando el reactivo de Bradford comercial Biorad

| | Curva Estándar | | | | | Muestra |
|--|----------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | Tubo1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | |
| Albúmina* (μl) | 0 (Blanco) | 5 | 10 | 15 | 20 | 0 |
| MEPBS-lac (100 mM) | 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 min. a t.a.

Tabla 4.II. Protocolo para la determinación del contenido proteico utilizando el reactivo de Bradford propio. Micrométodo.

| | Curva Estándar | | | | | Muestra |
|--|----------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | |
| Albúmina* (μl) | 0 (Blanco) | 10 | 50 | 75 | 100 | 0 |
| MEPBS-lac (100mM) | 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 $\mu\text{g/ml}$. Incubación: 15 min. a t.a.

4.4.3.4. Almacenamiento y concentración de la galectina purificada

4.4.3.4.1. En columnas de intercambio aniónico

Se procedió a la siembra en columnas de DEAE (col. DEAE) preparadas en jeringa de plástico de 5 ml. Sobre un piso de lana de vidrio se colocó 1 ml de DEAE, se equilibró la columna con MEPBS 1/10 y luego se sembró el eluato 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

4.4.3.4.2. Dializada y Liofilizada

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

4.4.4. Caracterización bioquímica parcial de la galectina plaquetaria

4.4.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se efectuó la electroforesis en geles de PAGE-SDS según se detalla en el inciso 4.2.1.

4.4.4.2. Inmunoblotting

Se efectuó la transferencia electroforética de los geles de PAGE-SDS según se detalla en el inciso 4.2.2.

Tabla 4.III. Protocolo de trabajo de las purificaciones de Gal-1 a partir del extracto citosólico plaquetario (ECP).

Las purificaciones 13, 14 y 15 se efectuaron con los protocolos 1, 2 y 3 respectivamente.

Se repitió el procedimiento con las purificaciones 16, 17 y 18.

| N° P | N°B | tA G | F | Lac | C/ D | L | DEAE | D | CA | MEPBS- CINa | MEPBS 1x | MEPBS 1/10x | EICA | Col DEAE | D/ L | HPLC- MS |
|------|-----|---------|---|-----|---------|---|------|---|----|----------------|-------------|----------------|------|-------------|---------|-------------|
| 1 | 5 | II | | • | • | | • | | • | • | | • | • | • | | |
| 2 | 25 | II | • | • | • | | • | | • | • | | • | • | | • | |
| 3 | 24 | III | • | • | • | | • | | • | • | | • | • | • | | |
| 4 | 4 | III | • | • | • | | | • | • | | • | • | • | • | • | |
| 5 | 27 | II | • | • | • | | | • | • | | • | • | • | • | • | |
| 6 | 30 | II | • | • | • | | | • | • | • | | • | • | • | • | • |
| 7 | 12 | IV | • | | | • | | | • | • | | • | • | | | |
| 8 | 2 | I | • | | | • | | | • | | • | • | • | | • | |
| 9 | 28 | II | • | • | | • | | • | • | • | | • | • | • | • | • |
| 10 | 6 | III | • | • | | • | | • | • | • | | • | • | • | • | |
| 11 | 30 | II | • | • | • | | | • | • | | • | • | • | • | • | |
| 12 | 20 | II | • | • | | • | | • | • | • | | • | • | • | • | |
| 13 | 30 | II | • | • | • | | • | | • | • | | • | • | • | | |
| 14 | 30 | II | • | • | • | | | • | • | | • | • | • | • | | |
| 15 | 30 | II | • | • | | • | | • | • | • | | • | • | • | • | • |
| 16 | 27 | II | • | • | • | | • | | • | • | | • | • | • | | |
| 17 | 27 | II | • | • | • | | | • | • | | • | • | • | • | | |
| 18 | 27 | II | • | • | | • | | • | • | | • | • | • | • | • | |

N°P, número de purificación; N°B, número de bolsas; tA-G, tiempo de almacenamiento-grupo (I,II,III,IV); F, filtración; Lac, agregado de lactosa; C/D, congelamiento/descongelamiento; L, lisis con agente lisante; DEAE, cromatografía de intercambio aniónico; D, diálisis; CA, columna de afinidad; MEPBS-CINa, lavado de alta fuerza iónica; MEPBS 1x, lavado de alta fuerza iónica optativo; MEPBS 1/10x, lavado de baja fuerza iónica; EICA, elución de la columna de afinidad; col DEAE, columna de DEAE; D/L, diálisis/liofilización.

Materiales y Métodos

En la **Tabla 4.III** se representan las diferentes purificaciones, con las variaciones efectuadas en el protocolo de obtención de Gal-1 plaquetaria a partir del ECP (protocolo 1, 2 y 3), en base a los seguimientos realizados por *western blot*, de las alícuotas de cada paso.

El protocolo 1 consistió en realizar una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE), luego, el eluido se sembró en la columna de afinidad (CA) y por último se realizó la concentración en una col DEAE.

El protocolo 2 consistió en realizar una diálisis con MEPBS 1/10x-Mercaptoetanol, luego el dializado se sembró en la CA y por último se realizó la concentración en una col de DEAE.

El protocolo 3 consistió en realizar una diálisis con MEPBS 1/10x-Mercaptoetanol, luego el dializado se sembró en la CA, y posteriormente se eluyó dividiendo el eluido en dos fracciones, para luego ser analizadas por *western blot*.

A su vez, se realizó la determinación de proteínas totales y la actividad biológica por hemoaglutinación de las alícuotas reservadas de cada paso de cada protocolo de purificación.

4.4.4.3. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria purificada

4.4.4.3.1. 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, con agitación periódica. Luego, los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato-salina (PBS: PO₄H₂K/PO₄HK₂ 150 mM-CINa 150 mM, pH 7.2) y se fijaron en glutaraldehído fresco al 1% durante 1 h, a t.a. con 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.

4.4.4.3.2. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante

La cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria se llevó a cabo en placas de Terasaki, utilizando GRCD preparados como se indicó anteriormente. Cada pocillo de la placa se sembró con 5 µl de cada dilución de los extractos preparados en CINa 150 mM y 5 µl de albúmina sérica bovina al 1% en CINa 150 mM. Se incubó 1 h a t.a. Se efectuaron controles de GRCD incubados en ausencia de muestra. La lectura se realizó microscópicamente, considerándose

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.

Se consideró que la mayor dilución de una muestra que presentó hemoaglutinación positiva 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 define como el número de UH/mg de proteína soluble (Ahmed H. *et al.*, 1996).

4.4.4.4. Análisis de la galectina obtenida por RP-HPLC-MS

Se realizó en colaboración con el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel y L. Yoshizaki).

La *cromatografía líquida de alta eficacia* (HPLC) acompañada por la *espectrometría de masa* (MS) es una técnica de laboratorio de química analítica para la identificación, cuantificación y análisis de masa de diferentes sustancias o compuestos. La MS permite la elucidación estructural de moléculas desconocidas a través de la fragmentación. La HPLC utiliza la afinidad intrínseca de un compuesto tanto para una *fase móvil* (típicamente un disolvente tamponado) como para una *fase estacionaria* (soporte sólido poroso con recubrimiento especializado). Esencialmente, se utiliza una bomba para proporcionar un flujo continuo de un disolvente en el que se introduce la muestra disuelta. Una vez que la muestra está en el flujo de disolvente, viaja a través de una columna analítica. Los compuestos presentes en la mezcla de muestras se separan entonces dependiendo de su afinidad con las partículas revestidas en la columna. Después de separar los componentes de la muestra, pasan a través de un detector de masa. La respuesta del detector de masas y el *tiempo de retención* (tiempo que tarda un compuesto en pasar del inyector al detector) del compuesto o compuestos de interés pueden entonces compararse con un material de referencia.

Realizamos el análisis por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) de la solución con la lectina, haciéndola pasar por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente, dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El *tiempo de retención* se

Materiales y Métodos

considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna, mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo (ACN). El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

La RP-HPLC consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . Nuestro trabajo se realizó utilizando dos columnas, C_8 y C_{18} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. Por lo tanto, el tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por el aumento de la entropía y la consecuente disminución de la energía libre, asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica, que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto.

En nuestro trabajo, utilizamos una columna Vydac C8, de 1,0 mm \times 30 mm, operando a 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, conectada a un Sistema Surveyor HPLC *on-line* con un espectrómetro de masas LCQ Duo (ESI Ion Trap) (Thermo Fisher, San José, CA, EE.UU.). Se varió la composición de la fase móvil durante el análisis (elución en gradiente). Por lo tanto, las proteínas se eluyeron usando un gradiente de 10 a 100% de disolvente, ácido acético al 2% y 96% de acetonitrilo (ACN) durante 15 min. Dicho gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad de la fase estacionaria. La caracterización de proteínas fue realizada por Full Scan 300-2000 amu y programa de deconvolución ProMass.

La *espectrometría de masas* (MS) es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas es

Materiales y Métodos

un dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. El espectrómetro de masas mide razones masa/carga de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto.

La fracción purificada de Gal-1 se redujo, fue carbamidometilada y digerida con tripsina en una relación 1:20 enzima / sustrato en urea 2 M, 0,1 M de bicarbonato amónico (pH 8,0) a 37 °C durante 20 h (Stone *et al.*, 1989). Los péptidos se separaron por RP-HPLC. El procedimiento se realizó en una columna Vydac C18, 250 × 1 mm (76 min de gradiente) conectado a un Espectrómetro de Masa LCQ Duo ESI-IT (*ThermoFisher*, San José, CA, EE.UU.). El detector fue operado en el modo dependiente de datos para tener una conmutación automática entre MS y la adquisición de MS / MS, detectando una exclusión selectiva de tres iones precursores más intensos obtenidos por fragmentación mediante la disociación inducida por colisión (CID).

Se utilizaron masas peptídicas y datos MS/MS para la identificación, comparando los datos experimentales con los datos teóricos, calculados a partir de bases de datos de secuencias denominados algoritmos de búsqueda en tándem MS: *Mascot* y *Sequest*.

4.4.4.4.1. Digestión enzimática y análisis por RP-HPLC-MS

4.4.4.4.1.1. Digestión enzimática en gel

Se procedió a cortar las bandas de interés del gel con bisturí, inmediatamente después del decolorado con metanol 30%. Luego se agregó acetonitrilo, se centrifugó y se descartó el líquido, colocándose luego en Speed Vac hasta que el gel tuviera aspecto de cerámica. Se utilizó ditiotreitól 10 mM para reducir los puentes disulfuro de la proteína y luego se bloquearon los mismos con iodoacetamida 55 mM. Se adicionó la tripsina en buffer NH_4HCO_3 50 mM (pH 8.0) de manera de lograr una concentración de 12 ng/ μl , incubando la muestra a 37 °C durante 24 h (Stone *et al.*, 1989). La extracción de los péptidos formados se realizó en NH_4HCO_3 , con el agregado posterior de acetonitrilo, agitando y sonicando cada vez. Luego el material fue inyectado en el equipo de HPLC-masa.

4.4.4.4.1.2. Digestión enzimática en solución

La metodología fue similar a la detallada en el inciso 4.4.4.4.1.1, pero se partió de la proteína purificada en solución.

4.5. Estudio de la co-localización de la Gal-1 y actina en plaquetas humanas por Microscopía Confocal (MC)

4.5.1. Preparación de Pthl para los ensayos de MC

Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos sanos ($n = 12$), sin ingesta de medicamentos durante los 10 días previos a la toma de muestra. El muestreo se realizó por punción venosa directamente en tubos de plástico que contenían anticoagulante (3,8 g% citrato de sodio, 9:1). La sangre entera se centrifugó a $100 \times g$ durante 10 min., el PRP se separó de la parte superior y se trató como se describe en el inciso 4.4.1.; las Pthl se resuspendieron a una concentración de $5 \times 10^{11}/L$ en PBS (Kordich *et al.*, 2003).

4.5.2. Co-localización de Gal-1 y actina en Pthl por MC

Se incubaron $5 \times 10^{11}/L$ Pthl con Tr 0,2 UI/ml (Wiener Lab., Rosario, Argentina) entre 15 y 180 s a $37^{\circ}C$, con la finalidad de obtener suspensiones de plaquetas activadas, la activación fue inhibida por el agregado de una gran cantidad de volumen de solución de lavado (PBS), seguido por centrifugación. Las Pthl en reposo y activadas se fijaron con una solución de formaldehído al 5%, pH: 6,5, durante 5 min. En este punto se probaron dos opciones experimentales diferentes, la experiencia 1 (**Exp 1**) y la **Exp 2**.

La **Exp 1** consistió en fijar las Pthl en portaobjetos en atmósfera húmeda a t.a. durante 24 h, y luego se continuó con el protocolo (**Tabla 4.IV**).

La **Exp 2** consistió en fijar las Pthl en tubo, se permeabilizaron con 0,5% de Triton X-100 en PBS-BSA al 1% durante 5 min., finalmente se colocaron en portaobjetos y se incubaron en atmósfera húmeda 15 min. a t.a. Luego se continuó con el protocolo (**Tabla 4.IV**).

Las Pthl en reposo y activadas (50 μL) se incubaron con el primer anticuerpo [anti-Gal-1/100 (cabra) en PBS-0,1% de albúmina] y/o con phalloidin-TRITC separado o simultáneamente durante 1 h a t.a. Después de tres lavados con PBS, se incubó con anti-cabra-IgG FITC [1/400 en PBS-0, 1% BSA), Sigma, St. Louis, EE.UU.] durante 1h a t.a. El control de la unión no específica del segundo antisuero se realizó con PBS.

Materiales y Métodos

Se observaron las muestras y se fotografiaron en una Olympus FV1000, con el objetivo 100 × y el empleo de dos láseres de diodo en estado sólido a 473 nm (15 MW) para FITC y 635 nm (29 MW) para TRITC (**Tabla 4.IV**).

Tabla 4. IV. Protocolo de trabajo de los experimentos de colocalización Gal-1/actina por MC.

| Tubo | Referencia | Pthl | Pthla | Fijación | Exp. | Perm. | Phalloidin-TRICT | Ac a Gal-1 (cabra) | Ac a cabra FITC |
|-----------------------------------|------------------|------|-------|----------|------|-------|--|--------------------|-----------------|
| 1 | R. PD Ta y Gal-1 | • | | • | 1 | • | • | • | • |
| 2 | R. PD Gal-1 | • | | • | | • | | • | |
| 3 | R. PD Ta | • | | • | 2 | • | • | | • |
| 4 | A. PD Ta y Gal-1 | | • | • | | • | • | • | • |
| Etapas realizadas en tubos | | | | | | | Etapas realizadas en portaobjetos | | |

R, reposo; **A**, activación; **Pthl**, plaquetas humanas; **Pthla**, plaquetas humanas activadas, **PD**, patrón de distribución; **Ta**, talina; **Gal-1**, galectina-1 endógena plaquetaria; **Exp. 1 y 2**, dos opciones experimentales probadas detalladas en el inciso 4.4.5.2; **Perm.**, permeabilización. **Phalloidin-TRICT**, marcador de actina; primer anticuerpo para la detección de Gal-1, **Ac a Gal-1(cabra)**; segundo anticuerpo, **Ac a cabra FITC**.

4.6. Estudio de la interacción de Gal-1 con otras proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas por IFI

4.6.1. Preparación de Pthl para realizar los ensayos de IFI

Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos sanos (n= 10), que no hubieran ingerido medicación durante los diez días previos al día de la toma de muestra, por punción venosa directamente en tubos plásticos conteniendo anticoagulante (citrato de sodio 3,8 %, 9:1).

La sangre entera se centrifugó a 100 × g durante 10 min y se separó el PRP de las 2/3 partes superiores y se trató como se describe en el inciso 4.4.1. Las Pthl se resuspendieron a una concentración $5 \times 10^{11}/L$ en PBS (Kordich *et al.*, 2003).

4.6.2. Patrón de localización de talina y actina en Pthl en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1, por IFI

La acción de la Gal-1 a través de sus ligandos plaquetarios fue estudiada en plaquetas en reposo, activadas con 0.2 U/ml de Tr durante 2 min, o adicionadas con Gal-1p, en una concentración subagregante determinadas en ensayos previos (0.5 μM) durante 30 min, revelando independientemente con anti-Gal-1p y anti-Ta, mediante IFI (**Tabla 4.V**).

Materiales y Métodos

Tabla 4.V. Protocolo de trabajo de los experimentos de localización de Ta y Gal-1 en Pthl en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1p, por IFI.

| Tubo | Ref. | Pthl | Pthla | Activ. (Tr o rGal-1h) | PBS | Lav. | Fijac. | Anti-Ta (ratón) | Anti-Gal-1 (conejo) | Incub. | 1.Anti ratón IgG-FICT | 2.Anti conejo IgG-FICT | | | |
|----------------------------|------------------------------|------|-------|-----------------------|-----|--|-----------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|--|---|---|
| 1 | IE ₁ | • | | | • | 3 Lav. con PBS Cent. c/ Lav./10 min | Form. 5% PH 6,5 en PBS 5 min | | | 37°C/ 30 min 2 Lav. con PBS | • | | | | |
| 2 | IE ₂ | • | | | • | | | | | | | | | • | |
| 3 | R. PD Ta | • | | | • | | | | • | | | | | • | |
| 4 | R. PD Gal-1 | • | | | • | | | | | | • | | | | • |
| 5 | R. rGal-1h In PD Gal-1 | | • | • | | | | | | | • | | | | • |
| 6 | A. Tr PD Ta | | • | • | | | | | • | | | | | • | |
| 7 | A. Tr PD Gal-1 | | • | • | | | | | | | • | | | | • |
| 8 | A. rGal-1h PD Gal-1 | | • | • | | | | | | | • | | | | • |
| 9 | A. rGal-1h PD Ta | | • | • | | | | | • | | | | | • | |
| Etapas realizadas en tubos | | | | | | | Etapas realizadas en portaobjetos | | | | | | | | |

Ref., referencias; **IE₁** y **IE₂**, controles de inespecificidad de los segundos anticuerpos 1 y 2 respectivamente; **R. reposo**; **A.** activación; **rGal-1h**, galectina 1 recombinante humana; **rGal-1hIn**, galectina 1 recombinante humana inhibida con Lac (50µg/µl) 30 min a t.a.; **Tr**, trombina; Gal-1, Gal-1 endógena plaquetaria; **Ta**, talina; Pthl, plaquetas humanas lavadas; **Pthla**, plaquetas humanas lavadas activadas; **PBS**, *Buffer* fosfato salino, ClNa 150 mM; primeros anticuerpos: **Anti-Ta (ratón)** y **Anti-Gal-1 (conejo)**; segundos anticuerpos: **Anti-ratón IgG-FICT** y **Anti-conejo IgG-FICT**; **PD**, patrón de distribución.

Las Pthl (50 µL) se fijaron en portaobjetos con formaldehído (5%, pH 6,5) durante 5 min y se procedió a la incubación con el primer anticuerpo antigalectina-1 porcino (anti Gal-1p) o antigalectina -1 recombinante humana (anti rGal-1h) obtenidos en conejos en nuestro laboratorio (González, 2008 y 2012 respectivamente) y anticuerpo antitalina (anti Ta) monoclonal obtenido en ratones (Sigma) durante 30 min a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS. Luego se incubó con el segundo anticuerpo anti-conejo IgG-FICT (Sigma) y anti-ratón IgG-FICT (Sigma), durante 30 min a 37°C, se lavó con PBS (buffer fosfato salino) y se observó en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Nikon Corp., Kawasaki JP) (**Tabla 4.V**).

4.7. Estudio de receptores / ligandos de Gal-1 en lisados de membrana de plaquetas humanas

4.7.1. Inmovilización de la Gal-1

Para la inmovilización de la Gal-1 se utilizó el protocolo descrito por Walzel *et al.*, 1999.

4.7.2. Enriquecimiento del receptor / ligando a partir del lisado de membranas plaquetarias producido por la interacción con Gal-1

Las membranas plaquetarias se obtuvieron como se describió en el inciso 4.4.2. El pellet resultante se lisó con una solución de MEPBS-EDTA (pH 7.2) adicionada con el detergente Tergitol-tipo NP-40 y con un cóctel de inhibidores de proteasas. Luego se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se incubó con Gal-1 durante 1 hora a 4 °C. Luego se siguió la técnica según el protocolo descrito por Walzel *et al.*, 1999.

4.8. Purificación y caracterización de Gal-1 en plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se obtuvo el PPP con la técnica descrita en el inciso: 4.4.1.1 y luego se procedió a purificar la Gal-1 y caracterizarla siguiendo el protocolo detallado en los incisos 4.4.3 y 4.4.4. Luego se derivaron las proteínas identificadas como Gal-1, en gel y liofilizadas, al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Facultad de Ciencias, Unidad de Bioquímica y Proteómica; Instituto Pasteur de Montevideo, para realizar la identificación de proteínas por mapeo peptídico mediante análisis MS y MS/MS (equipo Maldi-Tof-Tof).

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Obtención de rGal-1h

5.1.1. Transformación bacteriana

5.1.1.1. Transformación por shock térmico

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.1.1.**

5.1.1.2. Selección

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.1.2.**

5.1.1.3. Precultivo

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.1.3.**

5.1.1.4. Inducción

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.1.4.**

5.1.2. Extracción y purificación de rGal-1h del cultivo

5.1.2.1. Cosecha

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.2.1.**

5.1.2.2. Sonicación

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.2.2.**

5.1.2.3. Centrifugación

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.2.3.**

5.1.3. Purificación de rGal-1h

5.1.3.1. Columna de afinidad

Se procedió según se detalla en el inciso **4.1.3.1.**

5.1.3.2. Columna de polimixina

Se procedió según detalla en el inciso 4.1.3.2.

5.2. Caracterización bioquímica parcial de la rGal-1h

5.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los resultados obtenidos de la corrida electroforética realizada en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, de las purificaciones de rGal-1h junto a los marcadores de peso molecular se observan en la siguiente figura (**Fig. 5.1**).

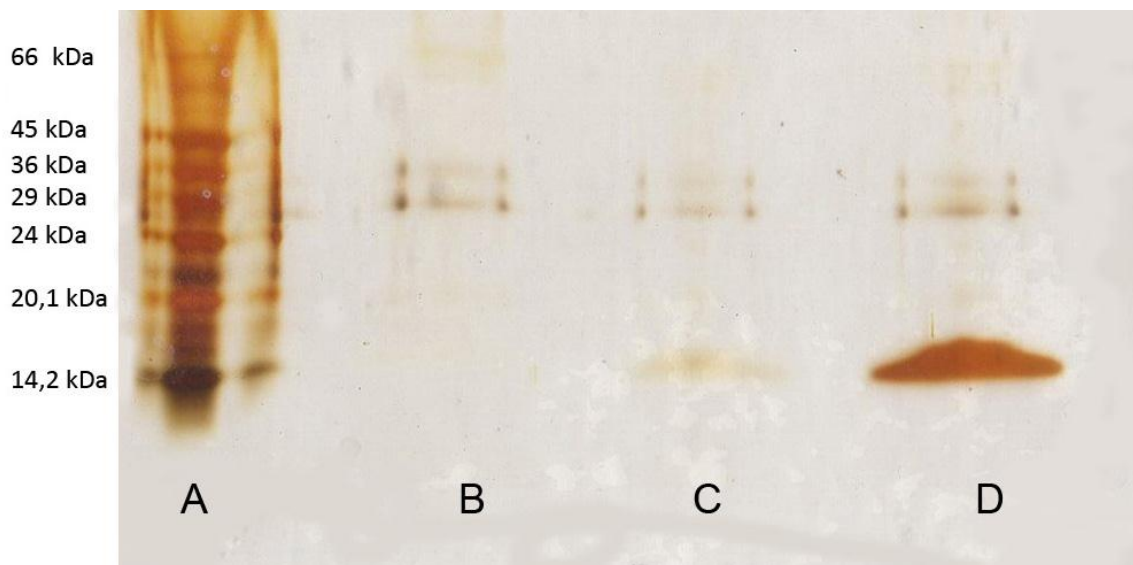


Figura 5.1. SDS-PAGE de rGal-1h en condiciones desnaturizantes. A) Los estándares de peso molecular utilizados corresponden a albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor del tripsinógeno (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,2 kDa). B), C) y D) Distintas purificaciones de rGal-1h. 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. 5.2. se muestran los resultados obtenidos de un *immunoblotting* de la rGal-1h donde se observan dos bandas de una purificación, una de 14,5 kDa (monómero) y otra de 29 kDa (dímero).

Resultados

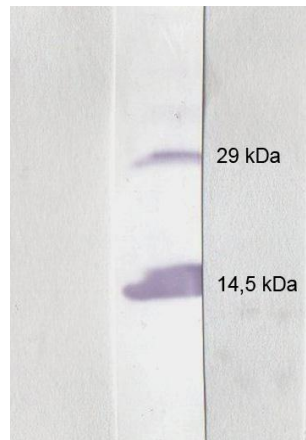


Figura 5.2. Immunoblotting de rGal-1h proveniente de una purificación. El gel de SDS-PAGE fue transferido a nitrocelulosa e incubado con anticuerpo policlonal anti-rGal-1h (Dil.= 1/5.000), y como 2º anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/1.000). Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato.

5.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti rGal-1h

Se obtuvieron los anticuerpos anti rGal-1h según el detalle del inciso 4.3. El título a utilizar se determinó mediante dotting, realizando diluciones de rGal-1h y del anticuerpo, obteniendo títulos de hasta 1/20.000 (Fig.5.3)

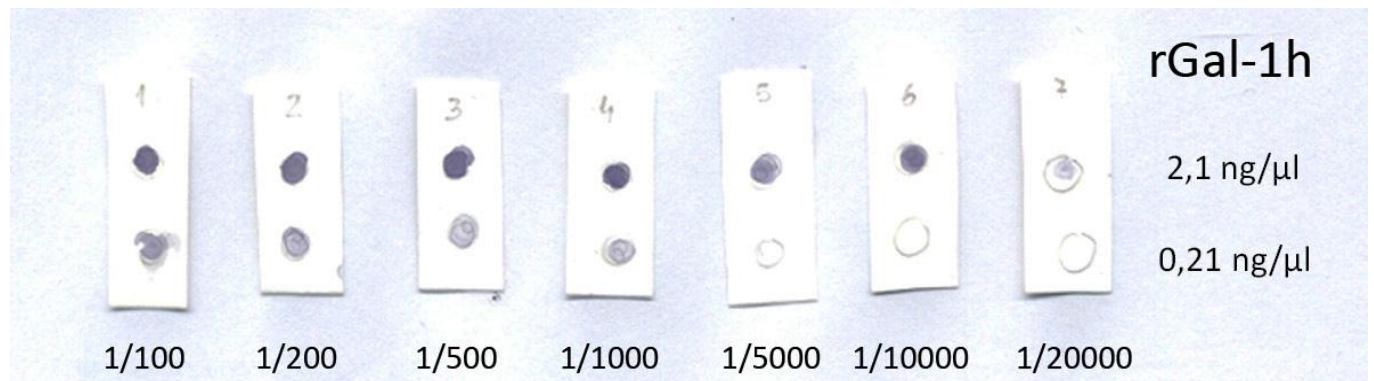


Figura 5.3. Dotting de anticuerpos anti rGal-1 h proveniente de sueros de conejo. Nitrocelulosa sembrada con dos concentraciones de rGal-1h (2,1 y 0,21 ng/μl), incubada con anticuerpo policlonal anti-rGal-1h (Dil.= 1/100, 1/200, 1/500, 1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 y 1/20.000), y como 2º anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/1.000). Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. rGal-1h: galectina-1 recombinante humana.

Resultados

5.4. Purificación y caracterización de Gal-1 en plaquetas humanas

5.4.1. Preparación de plaquetas humanas lavadas (Pth)

5.4.1.1. Plaquetas humanas sin leucodepleción

Se procedió según protocolo detallado en el inciso 4.4.1.1. En la **Fig. 5.4** se muestra el resultado del análisis de una alícuota del preparado de Pth sin leucodepleción en el contador Coulter de nuestro laboratorio. Se observó en el histograma de glóbulos blancos, que restaban leucocitos luego de la separación y lavado plaquetario.

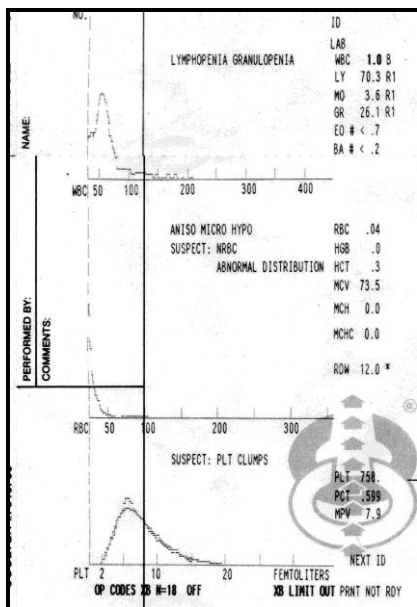


Figura 5.4. Histograma de Pth sin leucodepleción.

5.4.1.2. Plaquetas humanas leucodeplecionadas

Se procedió según protocolo detallado en el inciso 4.4.1.2. En la **Fig 5.5** se muestra el resultado del análisis de una alícuota del preparado de Pth leucodeplecionadas en el contador Coulter de nuestro laboratorio. Los primeros dos histogramas, de glóbulos blancos y de glóbulos rojos demuestran que no se hallaban dichas células en la alícuota procesada. El tercer histograma pertenece a las plaquetas, se observó la distribución homogénea de las Pth leucodeplecionadas.

Resultados

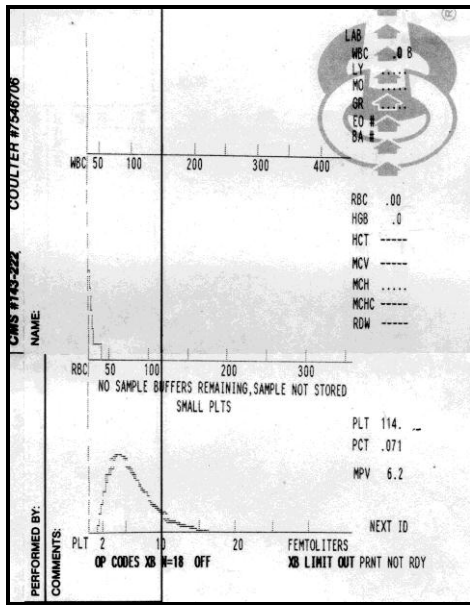


Fig.5.5. Histograma de Pth leucodeplecionadas.

5.4.1.3. Efecto del tiempo de almacenamiento plaquetario y otras variables

Mediante la caracterización bioquímica parcial de la lectina purificada (detallado en el inciso 4.4.4), pudimos comprobar que la edad plaquetaria, el pH, la irradiación y la presencia del inhibidor (PGE₁) en los diferentes buffers utilizados, no influían en los resultados de la purificación de la Gal-1 plaquetaria humana. Obtuvimos tres bandas: 14,5 kDa (Gal-1 monómero), 29kDa (Gal-1dímero) y 55kDa (Fig. 5.6).

Resultados

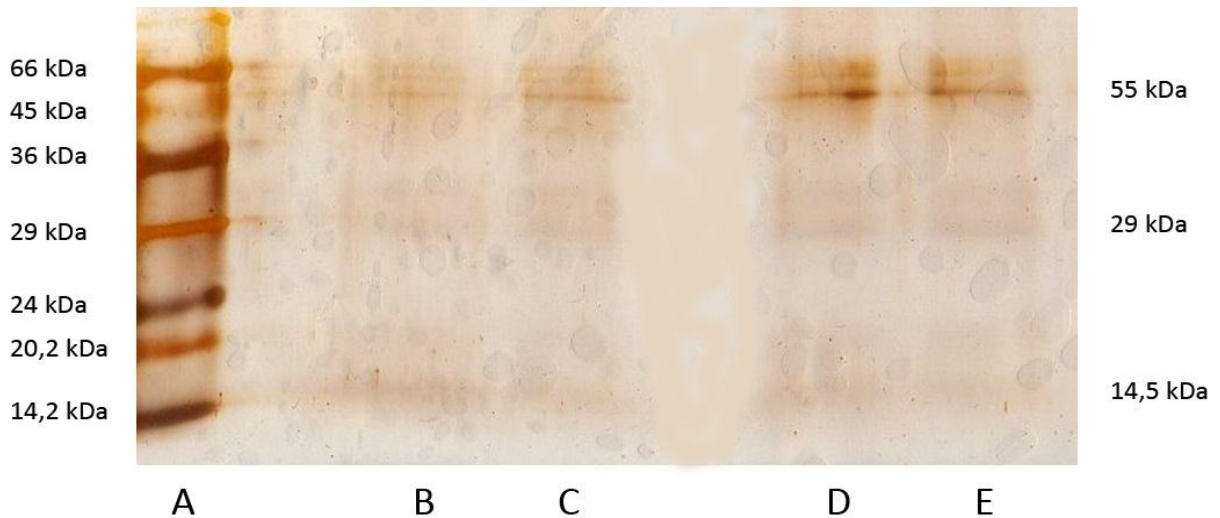


Figura 5.6. SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, de distintas purificaciones de Gal-1 plaquetaria, separadas según la edad (B: plaquetas de 24 h (grupo I), C: entre 24-48 h (grupo II), D: 48-72 h (grupo III) y E: 72 h-1 semana (grupo IV). A. Estándares de peso molecular utilizados: albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36kDa), anhidrasa carbónica (29kDa), tripsinógeno (24kDa), inhibidor del tripsinógeno (20,1kDa) y α -lactoalbúmina (14,2kDa). B, C, D y E: Purificaciones de Gal-1plaquetaria. Revelado con coloración argéntica. SDS: dodecil sulfato de sodio, PAGE: gel electroforético de poliacrilamida.

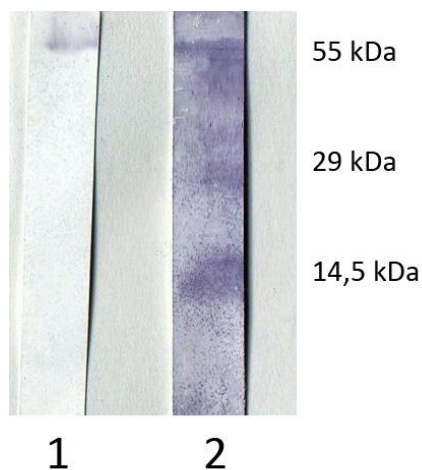


Figura 5.7. Inmunoblotting de Gal-1 plaquetaria proveniente de una purificación (grupo II). Las purificaciones del resto de los grupos (I, III y IV), dieron el mismo resultado. El gel de SDS-PAGE fue transferido a nitrocelulosa e incubado: 1. Con anticuerpo anti-Actina (Dil = 1/1.000) y 2. Con anticuerpo policlonal anti-rGal-1h (Dil.= 1/5.000), y como 2° anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/1.000). Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. SDS: dodecil sulfato de sodio, PAGE: gel electroforético de poliacrilamida.

Resultados

5.4.2. Obtención del extracto citosólico plaquetario y de las membranas

Se ensayaron dos formas de lisis plaquetaria: por congelamiento-descongelamiento y por acción de un agente lisante.

5.4.2.1. Lisis de las membranas plaquetarias por congelamiento-descongelamiento

Se procedió según técnica detallada en el inciso 4.4.2.1.

5.4.2.2. Lisis de las membranas plaquetarias con un agente lisante

Se procedió según técnica detallada en el inciso 4.4.2.2.

5.4.3. Purificación de la galectina plaquetaria

5.4.3.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico

Se procedió según protocolo detallado en el inciso 4.4.3.1.

5.4.3.2. Cromatografía de afinidad

Se procedió según técnica detallada en el inciso 4.4.3.2.

5.4.3.3. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

1). Reactivo comercial (Biorad)

Tabla 5.I. Curva de calibración del reactivo de Bradford comercial. R (coeficiente de variación)=0.9848; A (ordenada al origen)=0.189; B (pendiente) =0.036.

| Conc. Alb. ($\mu\text{g/ml}$) | Abs. (595 nm) |
|---------------------------------|---------------|
| 0 | 0 |
| 6.3 | 0.428 |
| 12.5 | 0.646 |
| 18.8 | 0.784 |
| 25.0 | 1.124 |

Resultados

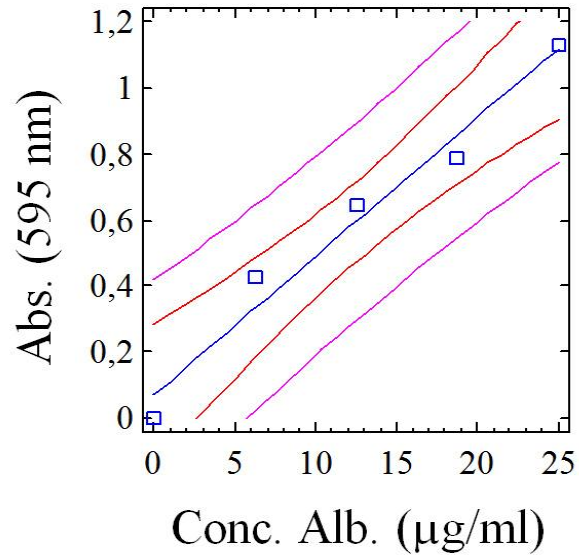


Figura 5.8. Regresión lineal de la curva de calibración del reactivo de Bradford comercial.

2). Reactivo de preparación propia

Tabla 5. II. Curva de calibración del reactivo de Bradford de preparación propia. $R = 0.9994$; $A=0.0066$; $B=0.0311$.

| Conc. Alb. (µg/ml) | Abs. (595 nm) |
|--------------------|---------------|
| 0 | 0 |
| 10 | 0.033 |
| 50 | 0.303 |
| 75 | 0.453 |
| 100 | 0.627 |

Resultados

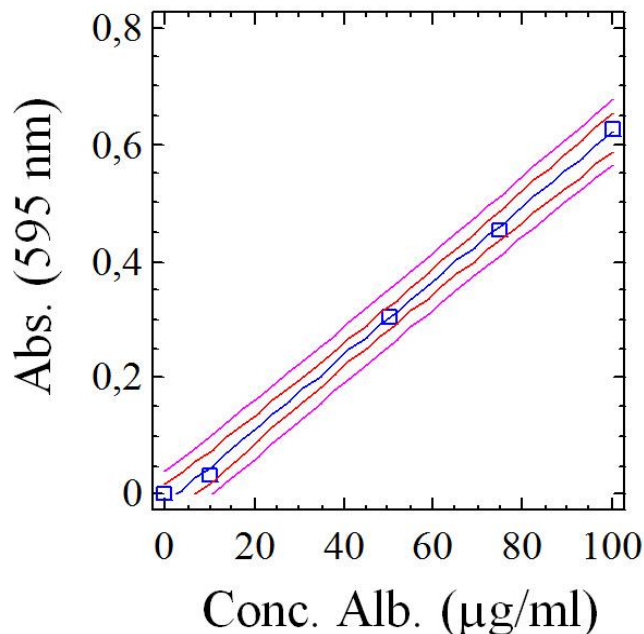


Figura 5.9. Regresión lineal de la curva de calibración del reactivo de Bradford de preparación propia.

5.4.3.4. Almacenamiento y concentración de la galectina purificada

5.4.3.4.1. En columnas de intercambio aniónico

Se procedió como se describe en el inciso 4.4.3.4.1.

5.4.3.4.2. Liofilizada

Se procedió como se describe en el inciso 4.4.3.4.2.

5.4.4. Caracterización bioquímica parcial de la galectina plaquetaria

5.4.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó la corrida electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes del marcador de PM, de las alícuotas de cada paso de cada purificación de Gal-1 plaquetaria realizada y del purificado final, n = 18.

Resultados

5.4.4.2. Inmunoblotting

En las Fig. 5.10, 5.11 y 5.12, se muestran los inmunoblotting de las alícuotas de cada paso de los tres protocolos realizados (1, 2 y 3) de tres purificaciones diferentes.

La Fig. 5.10 muestra el inmunoblotting del **protocolo 1**, realizando los pasos de la purificación detallada en el inciso 4.4.3.

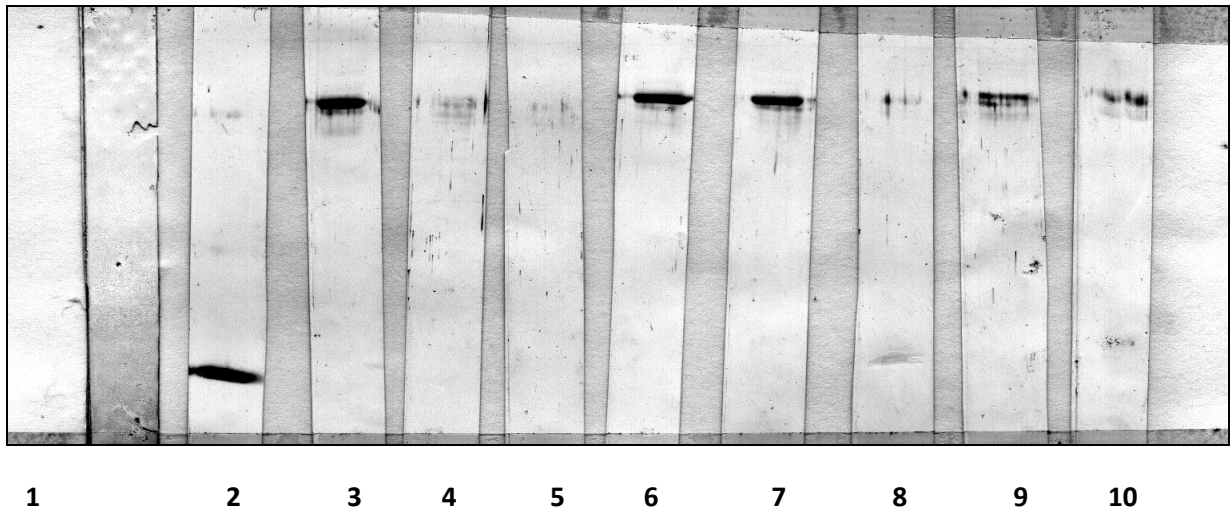


Figura 5.10. Pasos de la purificación de Gal-1 plaquetaria. Protocolo 1. Línea 1, marcador de PM; Línea 2, rGal-1h (control); Línea 3, ECP previo DEAE; Línea 4, ECP no pegado al DEAE; Línea 5, primer lavado con MEPBS 1/10x del DEAE; Línea 6, eluido del DEAE con MEPBS-CINa; Línea 7, no pegado a la CA; Línea 8, eluido de la col DEAE; Línea 9, primer lavado con MEPBS-CINa de la CA; Línea 10, segundo lavado con MEPBS 1/10x de la CA. Todas las líneas fueron incubadas con anti rGal-1h como primer anticuerpo. Luego se procedió a incubar con el segundo anticuerpo, anti IgG peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. SDS, dodecil sulfato de sodio; PAGE, gel electroforético de poliacrilamida; ECP, extracto citosólico plaquetario; MEPBS, *buffer* de fosfatos; CA, columna de afinidad; col DEAE, columna de intercambio aniónico.

Resultados

La **Fig. 5.11** muestra el inmunoblotting del protocolo 2, realizando los pasos de la purificación detallada en el inciso 4.4.3 con algunos cambios al **protocolo 1** original, en base a los resultados de la **Fig. 5.10**.

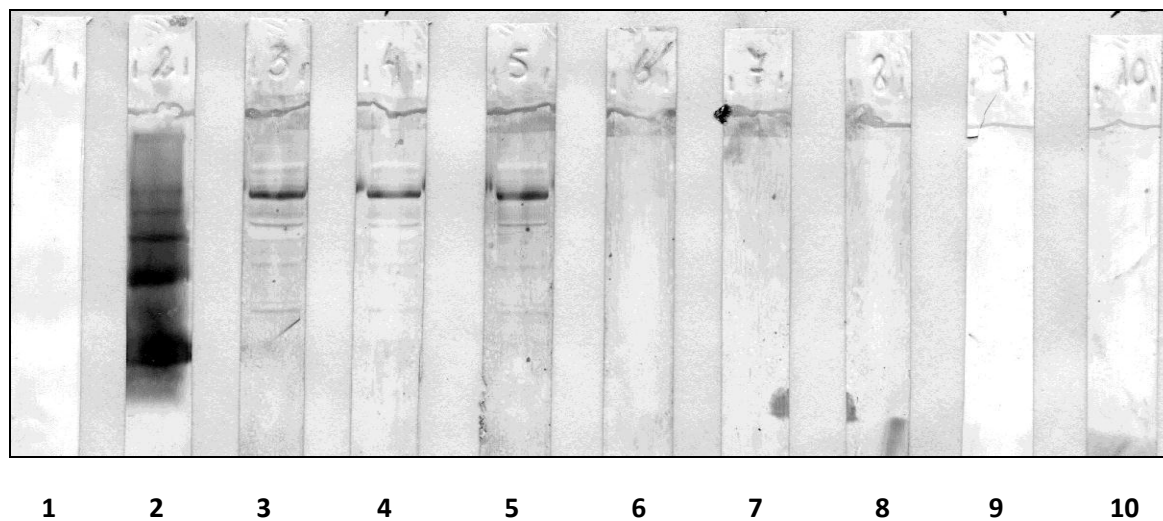


Figura 5.11. Pasos de la purificación de Gal-1 plaquetaria. Protocolo 2. Línea 1, marcador de PM; Línea 2, rGal-1h (control); Línea 3, ECP previo D; Línea 4, ECP post- D; Línea 5, no pegado CA; Línea 6, primer lavado CA con MEPBS 1x; Línea 7, segundo lavado CA con MEPBS 1/10x; Línea 8, eluido de la CA con MEPBS-lactosa; Línea 9, no pegado col DEAE; Línea 10, eluido col DEAE con MEPBS-CINa. Todas las líneas fueron incubadas con anti rGal-1h como primer anticuerpo. Luego se procedió a incubar con el segundo anticuerpo, anti IgG peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. SDS, dodecil sulfato de sodio; PAGE, gel electroforético de poliacrilamida; ECP, extracto citosólico plaquetario; MEPBS, *buffer* de fosfatos; CA, columna de afinidad; col DEAE, columna de intercambio aniónico; D, diálisis.

Resultados

La **Fig. 5.12** muestra el inmunoblotting del protocolo 3, realizando los pasos de la purificación detallada en el inciso 4.4.3 con algunos cambios realizados al **protocolo 1** y **2**, en base a los resultados de la **Fig. 5.10** y **Fig. 5.11**.

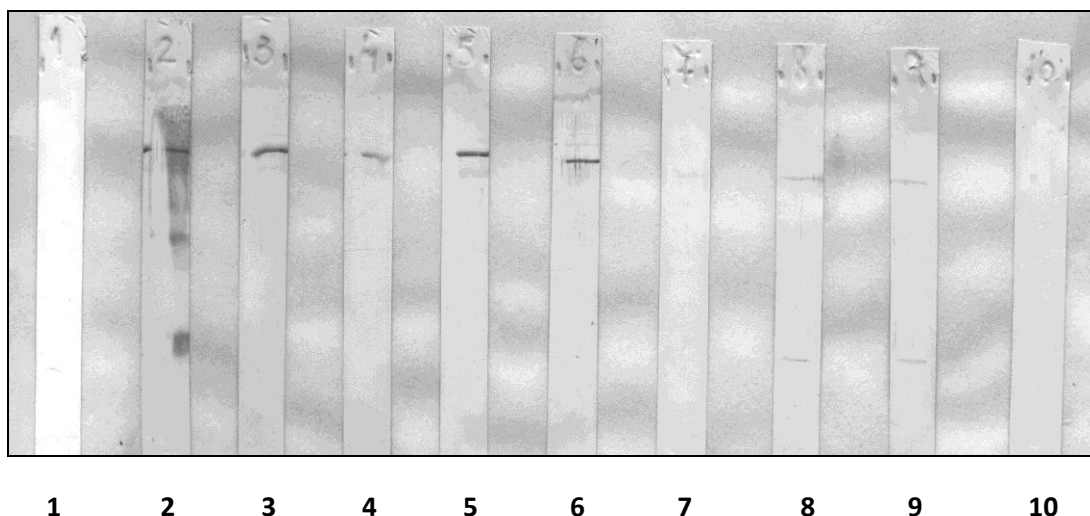


Figura 5.12. Pasos de la purificación de Gal-1 plaquetaria. Protocolo 3. Pasos de la purificación de Gal-1 plaquetaria. Protocolo 3. Línea 1, marcador de PM; Línea 2, rGal-1h (control); Línea 3, ECP previo D; Línea 4, ECP post- D; Línea 5, no pegado CA; Línea 6, primer lavado CA con MEPBS 1x; Línea 7, segundo lavado CA con MEPBS 1/10x; Línea 8, 1°eluido de la CA con MEPBS-lactosa; Línea 9, 2°eluido de la CA con MEPBS-lactosa; Línea 10, no pegado col DEAE. Todas las líneas fueron incubadas con anti rGal-1h como primer anticuerpo. Luego se procedió a incubar con el segundo anticuerpo, anti IgG peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. SDS, dodecil sulfato de sodio; PAGE, gel electroforético de poliacrilamida; ECP, extracto citosólico plaquetario; MEPBS, *buffer* de fosfatos; CA, columna de afinidad; col DEAE, columna de intercambio aniónico; D, diálisis.

Se consideró el **protocolo 3** para la purificación de la Gal-1 plaquetaria, por lo que, se procedió a realizar el *western blot* del ECP purificado, post D/L, reconstituido con MEPBS 1/10x. Se efectuó la transferencia electroforética de los geles de PAGE-SDS (**Fig. 5.13.A**) de acuerdo a lo descrito en el inciso 4.4.4.2 (**Fig. 5.13.B**).

Resultados

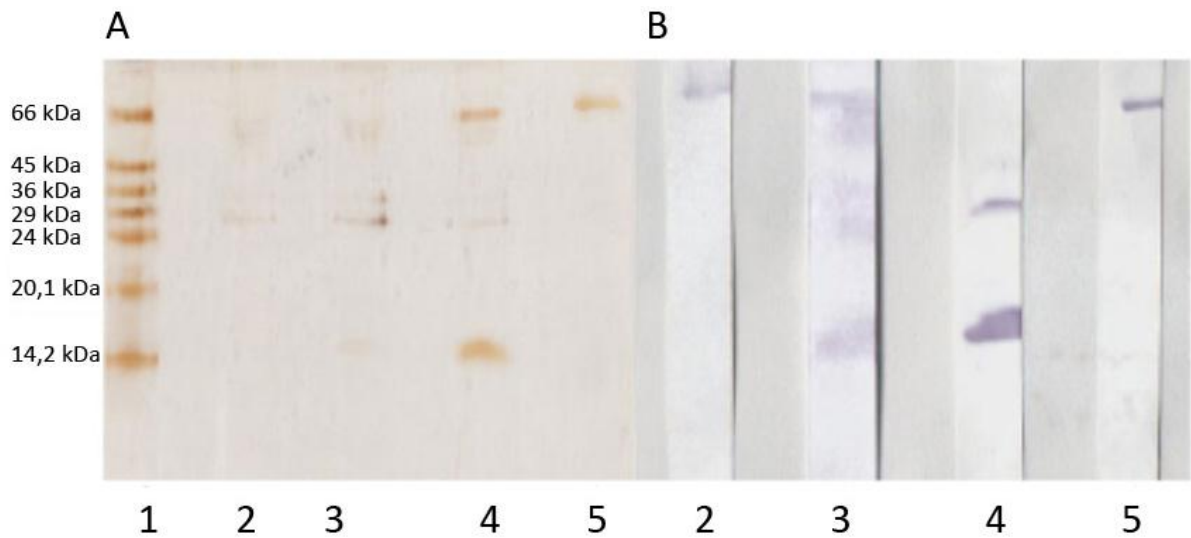


Figura 5.13. Western blot de la Gal-1 plaquetaria. A. SDS- PAGE de Gal-1 plaquetaria. Línea 1: los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas: albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor del tripsinógeno (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,2 kDa); Líneas 2 y 3: Gal-1 plaquetaria D/L reconstituida para sembrarla en gel, purificada con el protocolo 3; Línea 4: rGal-1h (Control); Línea 5, actina (Control). **B. Inmunoblotting.** Los gels de SDS-PAGE fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa; Líneas 2 y 3, Gal-1 plaquetaria revelada con anticuerpo anti-Actina y anticuerpo policlonal anti-rGal-1h respectivamente como primer anticuerpo; Línea 4, rGal-1h incubada con anticuerpo policlonal anti-rGal-1h (Control) como primer anticuerpo; Línea 5, Actina incubada con anticuerpo anti-Actina (Control) como primer anticuerpo. Luego se procedió a incubar con el segundo anticuerpo, anti IgG peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato. SDS: dodecil sulfato de sodio, PAGE: gel electroforético de poliacrilamida.

El rendimiento de cada purificación fue $6-10 \times 10^{-12}$ mg aproximadamente de proteína eluída/plaqueta humana. Fue calculado en base al número de Pthl totales de cada purificación (recuento plaquetario de una alícuota diluída 1/100, realizado en el contador Coulter, inciso 4.4.1.2) y la concentración determinada por el método de Bradford detallado en el inciso 4.4.3.3. Cabe señalar que el eluato contiene Gal-1 y actina por lo que la cantidad de Gal-1 no se pudo determinar con certeza

La Fig. 5.13 muestra los resultados obtenidos por SDS-PAGE de la fracción purificada de Gal-1 plaquetaria mediante la técnica descrita previamente (**inciso 4.4.3**), modificada de acuerdo al **protocolo 3**. Se observan las bandas de 14,5 kDa, 29 kDa y 55 kDa, en el gel y en el inmunoblotting. Las bandas de 14,5 kDa y 29 kDa correspondían a la fracción monomérica y dimérica de la Gal-1 plaquetaria, respectivamente, y la de 55 kDa, generó un interrogante sobre la identidad de la banda. Por lo que, frente a este hallazgo, pensamos en que podría tratarse de la Gal-1 unida a otra proteína. Probamos revelar el inmunoblotting con otros anticuerpos como: anticuerpo anti-Albúmina, anti-

Resultados

Haptoglobina y anti-Talina, resultaron negativos, por lo que, analizando el PM de la banda, y la bibliografía, pensamos en la actina. Probamos entonces con el anticuerpo anti-actina, dándonos un resultado positivo (Fig.5.13).

5.4.4.3. Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria purificada

La cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria, se llevó a cabo en placas de Terasaki, utilizando GRCD preparados como se indicó en el inciso 4.4.4.3.1 (Fig. 5.14).

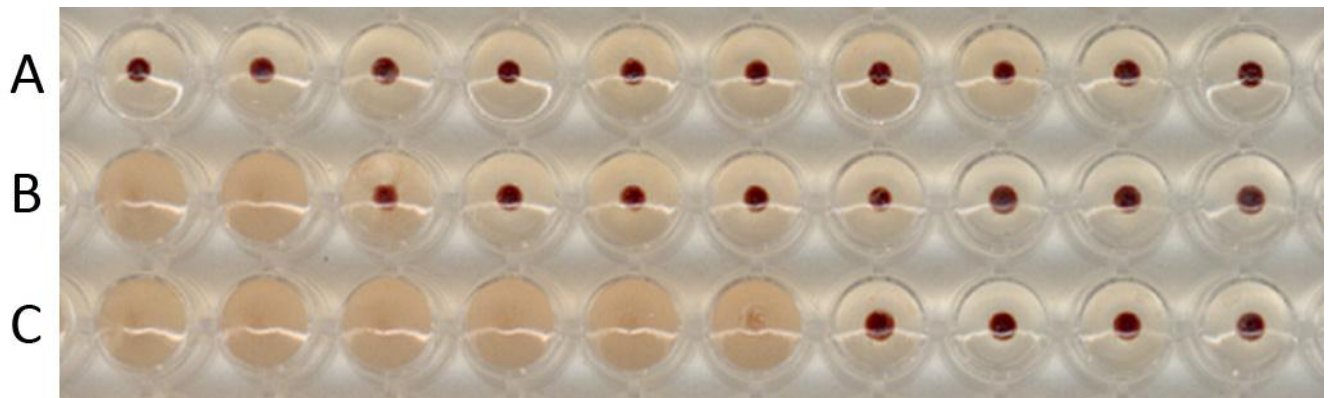


Figura 5.14. Cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la Gal-1 plaquetaria purificada. En microplaca en U, se incubaron los GRCD con diluciones crecientes de la lectina, de izquierda a derecha; **A.** Control negativo, GRCD incubados en ausencia de Gal-1.; **B.** Gal-1 plaquetaria, concentración de Gal-1 plaquetaria: 25µg/ml. Actividad específica: 3.019 UH/mg; **C.** Control positivo (rGal-1h). Concentración de rGal-1h empleada: 25µg/ml. Actividad específica: 51200 UH/mg.

5.4.4.4. Análisis de la galectina obtenida por RP-HPLC-MS

Se analizaron los gráficos obtenidos por RP-HPLC-MS, dilucidando el hallazgo de la Gal-1 y la actina, corroborando la co-purificación de las mismas obtenida previamente mediante la caracterización realizada por *western blot*.

5.4.4.4.1. Digestión enzimática y análisis por RP-HPLC-MS

5.4.4.4.1.1. Digestión enzimática en gel

Resultados

Se procedió como se detalla en el inciso 4.4.4.4.1.1 para poder inyectar el material en el equipo de RP-HPLC-MS.

5.4.4.4.1.2. Digestión enzimática en solución

La metodología fue similar a la detallada en el inciso 4.4.4.4.1.1, pero se partió de la proteína purificada en solución.

Con respecto al análisis por RP-HPLC y MS, la Fig. 5.15 muestra los resultados obtenidos; en la Fig. 5.15. A. se observa la RP-HPLC de Gal-1 plaquetaria; y en la Fig. 5.15. B. el análisis por MS por electropulverización del primer pico de elución de RP-HPLC, muestra tres especies moleculares con masas de 14.777, 14.853 y 14.929 respectivamente, correspondientes a la Gal-1 y sus derivados. Estos valores difieren exactamente por 76 entre sí, compatible con la formación de derivados con el β -mercaptoetanol agregado en el procedimiento de purificación. Las condiciones experimentales utilizadas tanto para RP-HPLC y MS fueron detalladas en el inciso 4.4.4.4.

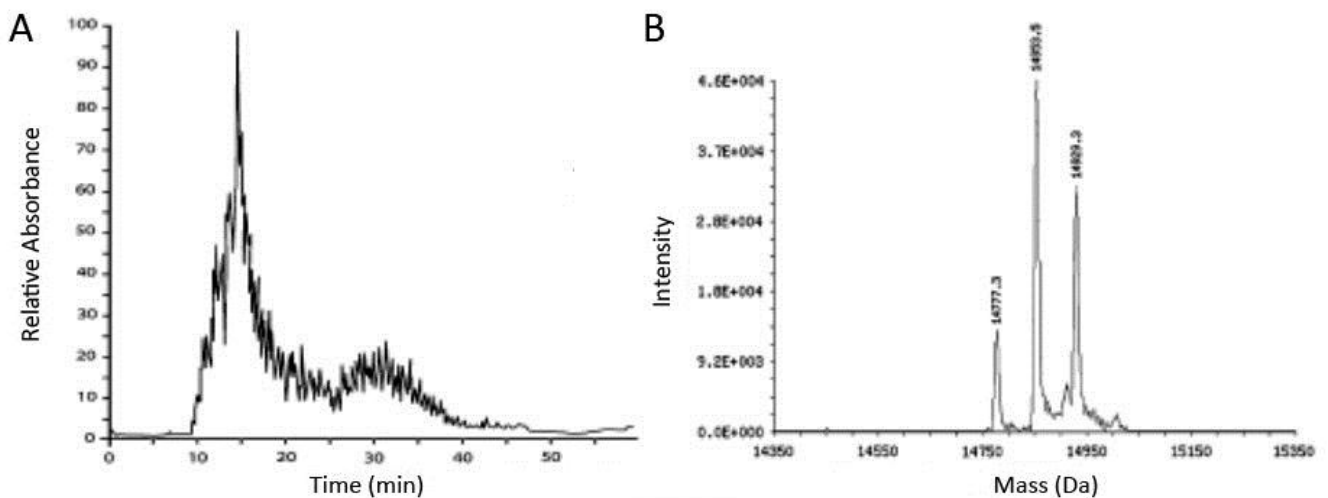


Fig. 5.15. A. Cromatografía RP-HPLC de Gal-1 plaquetaria. **B.** Análisis de espectrometría de masas del primer pico obtenido por RP-HPLC (Fig. 5.9. A.) en un espectrómetro de masas. La caracterización de proteínas fue realizada por análisis completo utilizando el programa ProMass.

Resultados

Las masas de las proteínas presentes en el segundo pico de elución de la cromatografía RP-HPLC, no pudieron ser determinadas por el procedimiento utilizado en el primer pico, debido a la aparente heterogeneidad. Por lo que se sometió a dicha fracción a una digestión con tripsina y luego se procedió a identificar las proteínas por MS. Se usaron datos MS/MS para identificar proteínas, utilizando el sistema Mascot y algoritmos Sequest para buscar en las bases de datos UniProt/Swiss Prot, las secuencias. Los resultados obtenidos, incluido el análisis por fragmentación de péptidos, permitió la identificación de Gal-1 (tres péptidos secuenciados con un significativo XCorr) y actina (15 péptidos secuenciados con un significativo de XCorr), ambos presentes en esta fracción (**Tabla 5.III**).

Tabla 5.III. Identificación de proteínas del segundo pico de elución de la cromatografía RP-HPLC por MS.

| Proteína | N° de Acceso | Masa (kDa) | Secuenciación de péptidos | Porcentaje (%) |
|----------|--------------|------------|---------------------------|----------------|
| Gal-1 | gi 227920 | 14,6 | 3 | 30.3 |
| Actina | gi 112956 | 42 | 15 | 36.5 |

5.5. Estudio de la co-localización de Gal-1 y actina en plaquetas humanas por Microscopía Confocal (MC)

5.5.1. Preparación de las Pthl para los ensayos de MC

Se procedió como se describe en el inciso 4.4.5.1.

5.5.2. Co-localización de Gal-1 y actina en Pthl por MC

Como describimos previamente, la actina es una de las moléculas más abundantes de las plaquetas; en el análisis por MC se presentó en áreas rojas extendidas del citoplasma plaquetario, como se muestra por tinción phalloidin-TRICT, aprovechando la propiedad de la faloidina para unirse específicamente en la interfase entre las subunidades de actina F.

En las plaquetas en reposo, los patrones de fluorescencia de Gal-1 / actina fueron de co-localización (amarillo) y no fueron uniformes, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Por lo tanto, algunas presentaban patrones homogéneos centrados en el citoplasma, mientras que otras

Resultados

mostraron una distribución escasa y moteada. Por otro lado, en las plaquetas activadas con Tr que presentaban muchos filopodios, parecería ocurrir una segregación importante de Gal-1, detectándose una región polarizada verde en los mismos, corroborando de esta manera la presencia de la lectina. Por otro lado, aparecían áreas de co-localización de Gal-1 / actina y áreas donde ambas moléculas presentan un patrón aislado (**Fig. 5.16**).

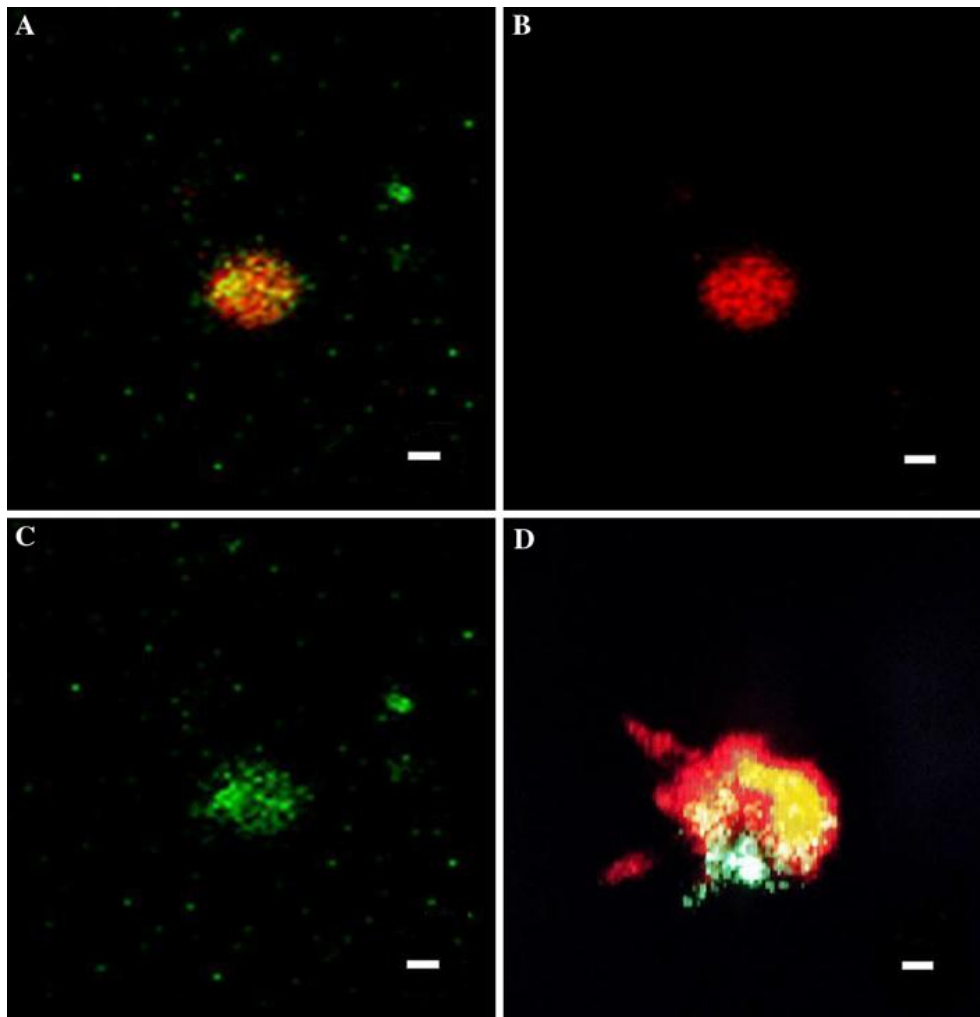


Fig. 5.16. Localización de Gal-1 endógena y moléculas de actina en plaquetas en reposo y activadas con Tr observadas por MC. Las plaquetas fueron fijadas y permeabilizadas como se describe en el inciso 4.4.5.2. Las plaquetas control, en reposo, muestran el siguiente patrón de fluorescencia: a. Colocalización de Gal-1-actina (amarillo), b. actina (rojo), c. Gal-1 (verde), d. plaquetas activadas con trombina (Tr) muestran áreas de colocalización de Gal-1 / actina y áreas donde ambas moléculas presentan un patrón aislado (Escala: bar= 1µm). MC: microscopía confocal; Gal-1: galectina-1 endógena plaquetaria; Tr: trombina.

5.6. Estudio de la interacción de Gal-1 con otras proteínas plaquetarias como parte de su mecanismo de acción en plaquetas humanas por IFI

5.6.1. Preparación de Pthl para realizar los ensayos de IFI

Se procedió según lo descrito en el inciso 4.4.6.1.

5.6.2. Patrón de localización de Ta y Gal-1 en Pthl en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1, por IFI

Analizando las imágenes de la Fig. 5.17, observamos que en plaquetas en reposo evidenciamos un patrón de distribución citoplásmico homogéneo para Ta y Gal-1 endógena. En plaquetas activadas con Tr, se observó un cambio de distribución a patrón periférico de ambas moléculas. En la incubación con Gal-1 se detectó un cambio parcial a localización periférica de Ta.

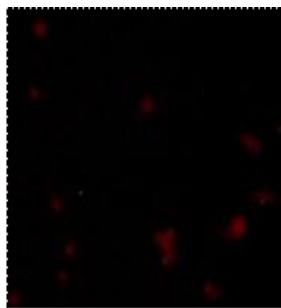


Fig. 1. Control de inespecificidad Ac- α -IgG-FITC de conejo (C3)

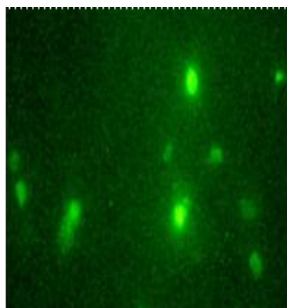


Fig. 2. Plaquetas en reposo. Patrón de distribución de Talina

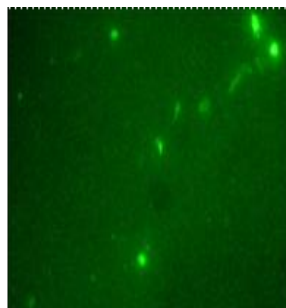


Fig. 3. Plaquetas en reposo. Patrón de distribución de Gal-1

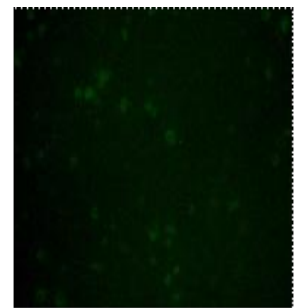


Fig. 4. Plaquetas en reposo con el agregado de Gal-1 inhibida con lactosa 100 mM (se incubó 30 min a 4°C)

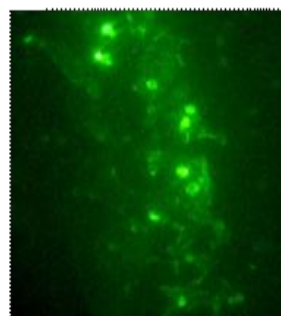


Fig. 5. Plaquetas activadas con trombina 0.2 U/ml, 2 min. Patrón de distribución de Talina

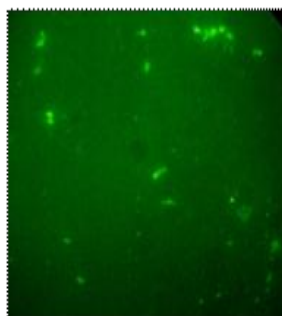


Fig. 6. Plaquetas activadas con trombina 0.2 U/ml, 2 min. Patrón de distribución de Gal-1

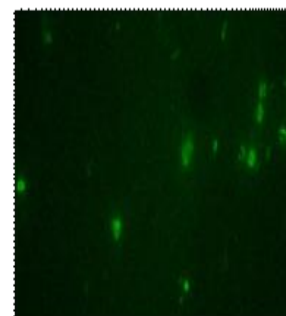


Fig. 7. Plaquetas incubadas con Gal-1. Patrón de distribución de Gal-1

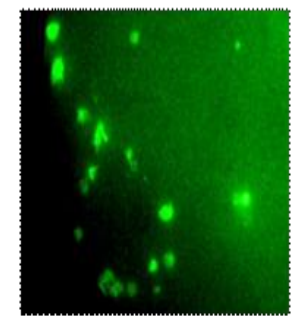


Fig. 8. Plaquetas incubadas con Gal-1. Patrón de distribución de Talina

Fig. 5.17. Patrón de localización de Ta y Gal-1 en plaquetas humanas lavadas en reposo o activadas con Tr, adicionadas con Gal-1, por IFI. Ta: talina, Tr: trombina, Gal-1: galectina-1, IFI: inmunofluorescencia indirecta.

5.7. Estudio de receptores / ligandos de Gal-1 en lisados de membrana de plaquetas humanas

5.7.1. Inmovilización de la Gal-1

Para la inmovilización de la Gal-1 se utilizó el protocolo descrito en el inciso 4.4.7.1.

5.7.2. Enriquecimiento del receptor/ligando a partir del lisado de membranas plaquetarias producido por la interacción con Gal-1

Procedimos como se describe en el inciso 4.4.7.2. Con respecto a este objetivo, pudimos obtener las membranas plaquetarias y realizar ensayos preliminares, pero consideramos que no era conveniente proseguir el estudio porque en la bibliografía se había publicado el hallazgo de posible receptor plaquetario para Gal-1 en forma paralela a nuestro trabajo, con lo cual este objetivo del trabajo de tesis había perdido originalidad.

5.8. Purificación y caracterización de Gal-1 en plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se obtuvo el PPP con la técnica descrita en el inciso: 4.4.1.1., luego se procesó una alícuota en un contador Coulter para controlar la carencia de plaquetas (Fig. 5.18).

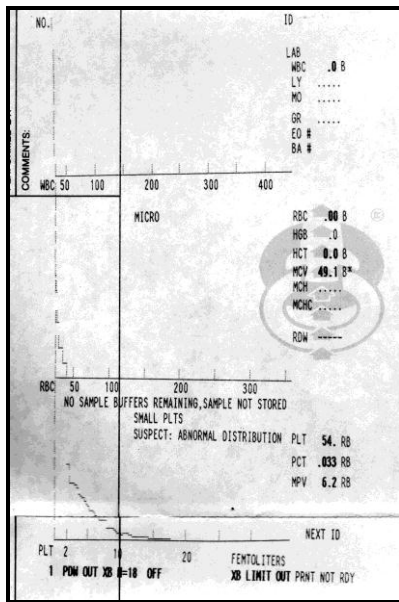


Fig. 5.18. Histogramas de una alícuota de PPP.

Resultados

Se procedió a purificar la Gal-1 y caracterizarla siguiendo el protocolo detallado en los incisos 4.4.3 y 4.4.4. En la Fig. 5.19 observamos los resultados obtenidos mediante la caracterización por PAGE-SDS y *Western blot*.

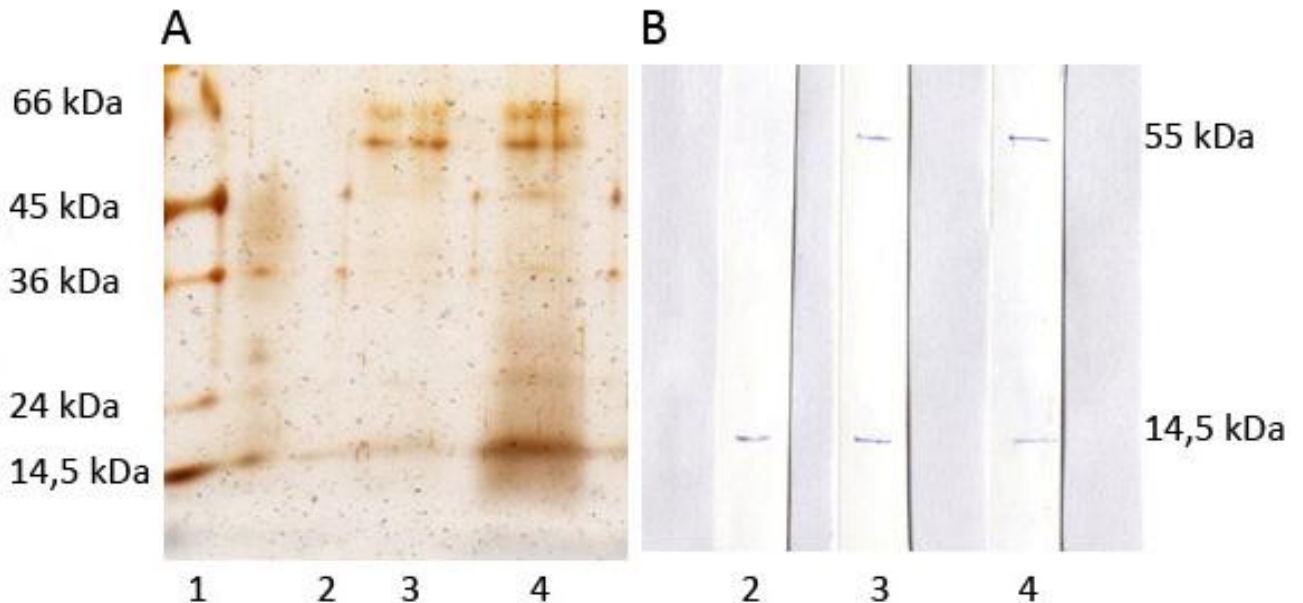


Figura 5.19. A. SDS- PAGE de Gal-1 plasmática. Línea 1: los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas: ovoalbúmina (45kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36kDa), tripsinógeno (24kDa), y α -lactoalbúmina (14,2kDa); Líneas 2 y 3: Gal-1plasmática de dos purificaciones independientes. Línea 4: rGal-1h (Control); **B. Inmunoblotting.** Los geles de SDS-PAGE fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa; Líneas 2, 3 y 4: reveladas con anticuerpo policlonal anti-rGal-1h, como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo anticuerpo IgG conejo peroxidasa. Revelado con 4-cloro-1-naftol como sustrato.

En algunas purificaciones realizadas en PPP obtuvimos una banda a la altura de 14,5 kDa y en otras aparecían bandas en la zona superior, entre los 45 y 66 kDa. Frente a estos resultados, nos planteamos si eran polímeros de Gal-1 o la Gal-1 estaba unida a una proteína plasmática que actuaría como transportadora. Por lo que realizamos revelados de las tiras de nitrocelulosa con anticuerpo anti-haptoglobina y anti-albúmina. Los resultados obtenidos utilizando dichos anticuerpos, fueron negativos. Por lo que, decidimos derivar las proteínas identificadas como Gal-1 en gel y liofilizadas al Instituto Pasteur de Montevideo para realizar la identificación de proteínas por mapeo peptídico mediante análisis MS y MS/MS (equipo Maldi-Tof-Tof). El análisis de los resultados de los espectros de masa obtenidos en un equipo Maldi-Tof-Tof no revelaron la presencia de la Gal-1.

6. Discusión general y conclusiones

Discusión general y conclusiones

Discusión general

Con la finalidad de ampliar nuestros estudios, en los que habíamos detectado previamente la presencia de ligandos para Gal-1 esplénica porcina (Gal-1p) en plaquetas humanas (González & Fink, 2006; González *et al.*, 2007; González & Fink, 2009), decidimos intentar purificar la Gal-1 endógena proveniente de las mismas.

Existen estudios sistemáticos para determinar la variabilidad biológica de las plaquetas humanas mediante estudios de proteómica cuantitativa. Se sabe básicamente que todos los procesos biológicos están regulados por proteínas, el proteoma, el que en contraste con el genoma es altamente dinámico y puede cambiar su composición tanto cualitativa como cuantitativamente a través del tiempo. Se ha demostrado que el 85% del proteoma plaquetario no muestra variación, concluyendo además que las plaquetas humanas comprenden aproximadamente 5000 proteínas (Burkhat *et al.*, 2012).

En relación a nuestro trabajo, la caracterización mediante electroforesis PAGE-SDS de la Gal-1 obtenida, tanto plaquetaria como plasmática, presentaba varias limitaciones inherentes considerablemente a su rango de aplicación: (1) la sensibilidad y el rango lineal/dinámico dependen del procedimiento de tinción; (2) antes de la MS, cada banda proteica de interés tenía que ser escindida, lavada, y sometida a digestión proteolítica dentro del gel, reduciendo así el límite de detección a expensas del costo/tiempo para identificar proteínas; (3) la cuantificación de la proteína se basaba en la intensidad de la banda después de la tinción, pero en muestras complejas, las bandas generalmente contenían más de una sola proteína, como el complejo actina-Gal-1 obtenido en el extracto citosólico plaquetario de nuestro trabajo; (4) la disponibilidad de pocas identificaciones podía impedir una validación completa para estimar la proporción de identificaciones de proteínas falsas positivas.

Con el avance de la tecnología se han producido significativos avances: 1) disponibilidad de MS mejorados que proporcionan sensibilidad, especificidad (precisión de masa, resolución) y velocidad/rendimiento (así como nuevas técnicas de exploración); (2) mejores sistemas y materiales LC de alto rendimiento que proporcionan una separación de muestras altamente complejas; y (3) nuevas estrategias bioinformáticas que permiten una interpretación de datos altamente compleja con medidas cualitativas bien definidas. Sin embargo, estos desarrollos requieren protocolos extensos y tediosos controles cualitativos para traducir los datos en resultados razonables.

Discusión general y conclusiones

En nuestro trabajo, utilizamos dicha tecnología pudiendo obtener resultados confiables para la detección y caracterización de la Gal-1 plaquetaria.

De este modo, utilizando LC-MS de última generación, es posible identificar y cuantificar miles de proteínas en horas con un alto nivel de calidad. Pero una limitación de estas técnicas sería la pérdida de la información sobre las isoformas de las proteínas, debido a que la identificación y la cuantificación se realiza a nivel de los péptidos. Sin embargo, se han desarrollado diferentes enfoques para analizar las proteínas, su cantidad, sus ligandos, su grupo N y C terminales, así como sus patrones de modificación post-traduccionales (PTM).

En los últimos años se ha determinado por MS cuantitativa que se encuentran 20 millones de moléculas de proteína por plaqueta, lo cual se correspondería con 1,5 y 1,8 mg \pm 0,2 mg de la masa total de proteínas/ 10^9 plaquetas; este hallazgo cubriría más del 80% del proteoma plaquetario completo (Burkhart *et al.*, 2012).

En nuestro trabajo, hallamos una concentración estimativa de Gal-1 de $6-10 \times 10^{-12}$ mg/plaqueta.

Burkhart *et al.* tuvieron como finalidad obtener un mapa cuantitativo del proteoma de las plaquetas humanas. La meta era establecer un protocolo optimizado y reproducible para el aislamiento de plaquetas con un claro enfoque en la pureza y para analizar el proteoma de las plaquetas aisladas a fondo, teniendo en cuenta las etapas adicionales de purificación y pérdidas de la muestra. Pudieron identificar aproximadamente 4000 proteínas individuales (con una tasa de falsos positivos –FDR– en el nivel de proteína $< 1\%$) y, utilizando el recuento espectral, compararon los datos de MS con los números de copias de 24 proteínas encontradas en la literatura. Debido al alto grado de correlación, se pudo estimar el número de copias para aproximadamente 3600 proteínas, ampliando de esta manera el conocimiento sobre la composición proteica de las plaquetas humanas (Burkhart *et al.*, 2012).

A partir de los datos cuantitativos de MS, se puede deducir que aproximadamente el 80% del proteoma plaquetario es estable inter- e intradonor. Esto estaría de acuerdo con los datos obtenidos por 2-DE, encontrándose un coeficiente de variación del 18% sobre la base de 500 puntos encontrados en plaquetas de donantes sanos reproducibles (Winkler *et al.*, 2008).

Discusión general y conclusiones

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio por IFI con PMN humanos, Chiesa *et al.* (2004) observaron que las plaquetas contaminantes daban reacción positiva para la detección de Gal-1 endógena (datos no publicados), hecho que nos estimuló para iniciar este trabajo. El presente trabajo es el primer informe de la purificación de Gal-1 de plaquetas humanas y realmente fue una meta muy difícil de lograr, principalmente por dos motivos. Por un lado, debido a que la cantidad de Gal-1 plaquetaria era muy baja, se requirieron grandes cantidades de bolsas de PRP o de concentrados plaquetarios para poder realizar cada purificación de la lectina (20 a 30 bolsas), y por el otro, debido a que el proceso de purificación e identificación de la proteína realizado fue largo y tedioso, para la obtención y análisis de los resultados de cada purificación. Finalmente, debe destacarse que se llevaron a cabo reiteradas purificaciones (18), poniendo a prueba diferentes condiciones experimentales (buffers, pH, antioxidantes, adaptación de columnas de afinidad y de intercambio iónico) para poder llegar a obtener los resultados presentados en este trabajo.

Finalmente, nuestros resultados demostraron que la Gal-1 co-purifica con la actina, de manera similar a los hallazgos descritos para otras células como linfocitos T (Pace *et al.*, 1999), células de músculo y de cerebro humano (Caron *et al.*, 1990; Joubert *et al.*, 1992) y glioblastoma humano (Camby *et al.*, 2002).

Si bien el eluato contiene proteínas, la concentración de $6-10 \times 10^{12}$ mg aproximadamente de proteína eluida/plaqueta humana corresponde al complejo Gal-1-actina. En estudios de proteómica de plaquetas, a la Gal-1 no se la incluye dentro de las 50 proteínas más abundantes (Martens *et al.*, 2005), sugiriendo la presencia de una reducida cantidad.

Recientemente, se ha estudiado la composición del proteoma de plaquetas humanas (Burkhart *et al.*, 2014), incluyendo a casi 4000 proteínas y estimando el número de copias de unas 3700. De los datos allí presentados, se sabe que hay cerca de 2×10^6 copias de actina por plaqueta, en tanto que se encontraron 8.000 copias de Gal-1 por plaqueta. Esto permitiría inferir que hay una relación Gal-1/actina de 1/250, lo cual confirmaría la baja concentración de Gal-1 plaquetaria.

La baja actividad hemaglutinante específica de la proteína purificada (3.019 UH/mg), comparándola con la rGal-1h (51.200 UH/mg), sugeriría que cuando la Gal-1 está formando el complejo con la actina, una cantidad significativa de Gal-1 puede permanecer como parte del complejo de actina

Discusión general y conclusiones

G-Gal-1, no pudiendo dimerizar y, en consecuencia, no pudiendo hemoaglutinar eritrocitos, de manera que toda la actividad observada correspondería solo a la Gal-1 libre.

A este trabajo se le sumaron otros enfoques experimentales, para apoyar el hallazgo del complejo, tales como RP-HPLC, MS y MC, los cuales avalaron el resultado obtenido previamente, confirmando de una manera fidedigna los resultados obtenidos.

Mediante RP-HPLC-MS logramos identificar el complejo Gal-1/actina, obteniendo la secuenciación de péptidos pertenecientes tanto a Gal-1 (3), como a la actina (15), con altos porcentajes de identificación, lo cual corroboró el resultado previo hallado por *western blot* en nuestro laboratorio.

El estudio de bandas de PM superior que podrían tratarse de oligómeros de Gal-1 o de Gal-1 asociadas a alguna proteína plasmática abordado mediante el uso de diferentes anticuerpos con diferentes especificidades (albúmina, haptoglobina) no condujo a resultados definitivos. Si bien en el trabajo de estudio de pacientes con cáncer de colon Bresalier et al. (2004), encontraron que la Gal-3 estaba unida a la haptoglobina como transportador, eso no fue posible de confirmarlo en el presente trabajo. Por otro lado, la caracterización de dichas proteínas, por RP-HPLC-MS, se hizo del mismo modo con el que habíamos hecho en las purificaciones del extracto citosólico plaquetario. La fracción de Gal-1 monomérica a partir del PPP se hallaba en muy baja concentración. Se sabe que el método de detección proteica por huella de masas peptídicas (PMF) necesita que exista una proteína mayoritaria; en nuestro caso, las bandas contenían proteínas que coelúan, solapando de esta manera la identificación de Gal-1, por hallarse en concentraciones minoritarias. Por lo tanto, sólo pudimos caracterizar en forma *parcial* la Gal-1 plasmática monomérica, concluyendo que las bandas superiores reveladas en forma positiva con anti Gal-1 podrían tratarse de oligómeros de la lectina.

Para relacionar estos hallazgos con lo que ocurre *in vivo* se realizaron estudios de MC, los que demostraron la co-localización de Gal-1 y actina tanto en plaquetas en reposo, como activadas con Tr. Estos hallazgos apuntarían los resultados obtenidos previamente mediante *western blot* y RP-HPLC-MS. Es decir que mediante tres metodologías diferentes se obtuvieron resultados coincidentes, pudiéndose confirmar que existe una relación entre la Gal-1 y la actina en la plaqueta, tanto en reposo como activada.

Discusión general y conclusiones

En base a los resultados de MC, podemos agregar que dicha interacción o relación entre ambas moléculas en las plaquetas se intensificaría al activarlas, poniendo en evidencia que ambas podrían participar en fenómenos de activación, tales como la transducción de señales intracelulares (González *et al.*, 2012).

En forma casi paralela, Pacienza *et al.* (2008), demostraron que Gal-1 desencadenaba diferentes respuestas de activación plaquetaria, incluyendo polimerización de F-actina, incremento en la expresión de P-selectina y GPIIIa, exposición de sitios de unión a Fb, expulsión de MPs y formación de agregados. Determinaron también que al tratar las plaquetas con rGal-1h se producían cambios conformacionales en $\alpha_{IIb}\beta_3$, los cuales constituían un prerrequisito para el entrecruzamiento de plaquetas. Este efecto era acompañado por cambios morfológicos de las plaquetas humanas que involucraban extensión de filopodios, lamelipodios y polimerización de actina.

La actina es una proteína globular de peso molecular 42kDa que se encuentra presente en todas las células eucariotas en concentraciones mayores a 100 μ M. A su vez, es una de las proteínas altamente conservadas, difiriendo en menos del 20% en especies tan diversas como las algas y los seres humanos. La actina es la subunidad monomérica de dos tipos de filamentos en las células: microfilamentos, uno de los tres componentes principales del citoesqueleto, y filamentos delgados. A fines de los años setenta y principios de los ochenta, se identificaron regiones de estrecho contacto entre la actina y la MEC. Estos incluyeron a la α -actinina, unida a filamentos de actina, la Vn, la Ta, y un receptor para la Fn. Estas proteínas interactuaban entre sí y con la actina, sugiriendo que funcionaban como un complejo de proteínas que mediaban las interacciones entre el Fb y la actina.

Se sabe que la invasión tumoral mediada por Gal-1 y la metástasis implica la reorganización del citoesqueleto de actina. Por otro lado, la actina tiene distintos tipos de interacciones con muchas proteínas estructurales, como por ejemplo las cadherinas. Las cadherinas son las principales moléculas de adhesión celular. Estas moléculas son glicoproteínas transmembranales responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos animales. Son moléculas de unos 700-750 aminoácidos, específicas del tipo celular. Como su nombre lo indica, son moléculas de adhesión calcio-dependientes. La adhesión celular a través de las cadherinas tiene un papel importante en procesos

Discusión general y conclusiones

fisiológicos como la morfogénesis, la estabilización y diferenciación y el establecimiento de la polaridad en los tejidos animales.

La acción de la Gal-1 exógena en ensayos heterólogos en las plaquetas y otras células proporcionaron pruebas de que estas células tienen receptores para proteínas unidas a carbohidratos que podrían inducir diferentes respuestas biológicas. Teniendo en cuenta que las plaquetas han marcado roles en la trombosis y la inflamación, el conocimiento de Gal-1 y sus posibles implicaciones en condiciones patológicas es relevante. La Gal-1 es importante en la función inmunológica y la regeneración del músculo, por lo que su expresión y localización en los tejidos adultos y leucocitos se sigue investigando hasta la actualidad. Para estudiar este aspecto se ha obtenido un anticuerpo monoclonal específico contra la Gal-1, denominado α hGal-1, que define un epítopo capaz de reconocer la secuencia de péptidos, que conservan Gal-1 en humanos y porcinos. Con el uso de la α hGal-1, se ha encontrado 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 Gal-1 tanto nuclear como citosólica (Días-Baruffi *et al.*, 2010) (**Fig. 6.1.**)

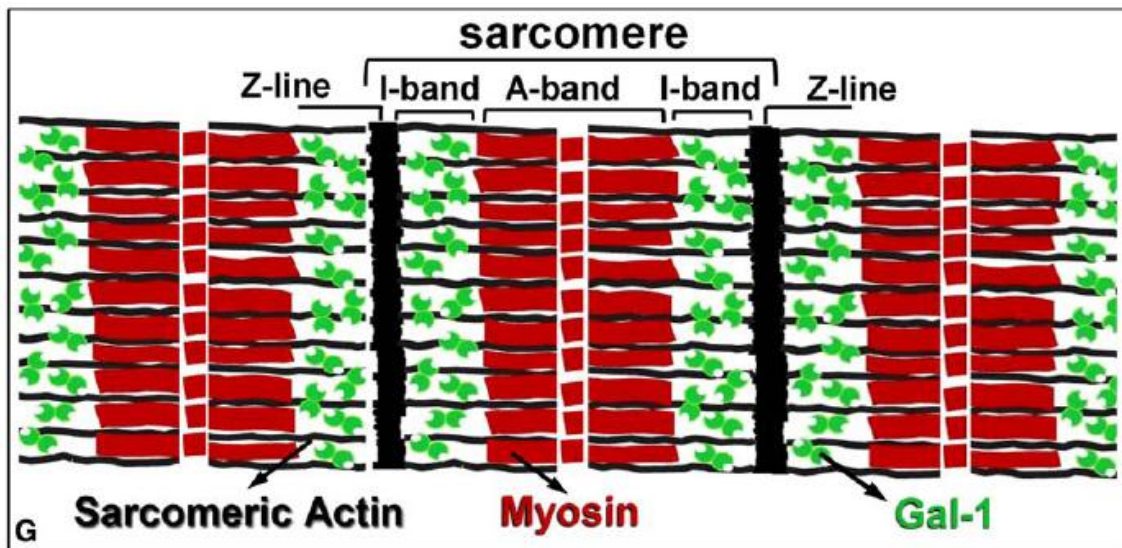


Figura 6.1. Esquema de la localización de Gal-1 en músculo estriado. Gal-1 colocaliza con actina sarcomérica pero no lo hace con la miosina del tejido muscular esquelético. Se trata de un esquema de

Discusión general y conclusiones

musculo estriado que muestra la localización predicha de Gal-1 en la región de la banda I, tal como se representa por los símbolos verdes. **Tomado de Dias-Baruffi *et al.*, 2010.**

Se encontró que la Gal-1 que se expresaba y se localizaba en las miofibrillas, podía presentar un patrón difuso citosólico y puntiforme. La localización de Gal-1 en la banda I sarcomérica podría estar relacionada con algunos aspectos de la contracción muscular como se describe para la lectina en músculo liso, mientras que la localización alterada en el músculo lesionado estaría relacionada con una función en la regeneración muscular. Finalmente, es claro que la Gal-1 y la actina sarcoméricas generalmente colocalizan en músculo cardíaco porcino, pero hay zonas que carecen de colocalización, hecho que podría ser una consecuencia de la contracción del músculo que promovería la formación de complejos intermoleculares requiriendo la participación de Gal-1, actina y otras moléculas presentes en las bandas I, tales como la titina (una de las proteínas mas grandes conocidas, formada por múltiples dominios, participa de la contracción del músculo estriado) y nebulina (proteína de PM aprox. de 800 KDa, se contacta con la actina, regulando la longitud de su filamento, permitiendo la interacción de la actina con la miosina durante el movimiento contráctil) (Dias-Baruffi *et al.*, 2010).

Por lo tanto, comparando nuestros resultados con el trabajo de Dias-Baruffi *et al.* (2010) podemos concluir que la Gal-1 plaquetaria, se hallaría en un equilibrio entre su forma monomérica y complejada a la actina, coincidentemente con los hallazgos obtenidos en músculo cardíaco porcino. Proponemos que la Gal-1 participaría de la activación y agregación plaquetaria, de manera similar a las funciones de la misma en el músculo porcino, facilitando la contracción y promoviendo la formación de complejos intermoleculares, requiriendo la participación de actina y otras moléculas de la MEC.

El repertorio de moléculas presentes en las adhesiones celulares, célula-MEC y célula-célula se ha ampliado considerablemente desde los primeros descubrimientos de los complejos centrales. Ahora se ha aclarado que ambas adherencias son muy complejas, consistentes en más de 150 proteínas que se pueden clasificar en módulos de funciones comunes. Los módulos citoplásmicos realizan tres funciones principales: en primer lugar, establecen el enlace estructural de las adherencias con el citoesqueleto de actina, en segundo lugar, modulan la organización de la actina y la dinámica y, en tercer lugar, desencadenan vías de señalización. Juntos forman una intrincada red que facilitaría la asociación dinámica de la actina al citoesqueleto de la MEC con las células adyacentes. (**Fig. 6.2.A**) (Bachir *et al.*, 2017).

Discusión general y conclusiones

Estas diferentes adhesiones complejas comparten algunas de las mismas proteínas y el mecanismo potencial de regulación y vías cruzadas. También participan proteínas específicas que no se encuentran en las adhesiones MEC-células, incluyendo espectrina, ZO-1 (zonula ocludens-1, proteína de anclaje a la actina), ajuba (proteína que regula la proliferación y diferenciación celular), afadin (AF-6, regula las adherencias célula-célula luego de la activación Ras) y EPLIN (proteína epitelial asociada al citoesqueleto, que se pierde en la neoplasia, aumentando la posibilidad de metástasis), la mayoría se reclutan en el complejo cadherina-catenina mediante la interacción con la α -catenina. El enlace entre las moléculas de adhesión del núcleo y del citoesqueleto de actina en ambos sitios de adhesión puede variar en su composición y probablemente reflejan diferentes requisitos para la cadherina y los receptores transmembrana de la integrina. Hay diferentes moléculas de la MEC a las que se unen las integrinas (por ejemplo, Col, lamininas, Fn), y diferentes tipos o etapas de adhesión (**Fig. 6.2.B**) (Bachir *et al.*, 2017).

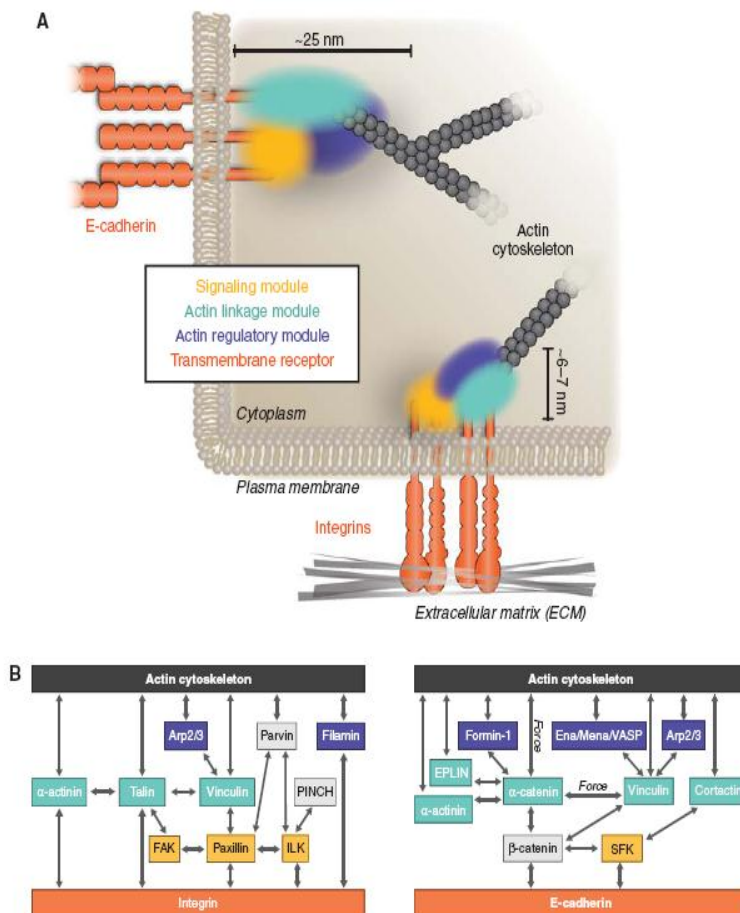


Figura 6.2. Organización de los módulos funcionales de la adhesión celular. (A) Célula-MEC y las adhesiones célula-célula son compartimentadas en módulos con distintas propiedades funcionales. Relación física entre el citoesqueleto de actina (Gris) y los receptores de adhesión transmembrana (naranja) está mediada por el módulo de enlace de actina (azul), que contiene moléculas que se unen a actina. La regulación de este enlace y la organización de la actina local está mediada por componentes de los módulos reguladores de actina (azul) y de la señalización (amarillo). **(B) Las interacciones moleculares de las proteínas en los diferentes módulos de adhesión entre el citoesqueleto de actina (gris) y los receptores de adhesión (naranja).** Los módulos funcionales en ambos sitios de adhesión se segregan espacialmente (con solapamiento parcial) y, en las adherencias MEC-célula (izquierda), se ha organizado dentro de los estratos organizacionales verticales entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Arp, proteína relacionada con actina; MEC, matriz extracelular; EPLIN, proteína epitelial *perdida* en la neoplasia (LIMA1); FAK, quinasa focal de adhesión; ILK, quinasa unida a integrina; SFK, quinasa de la familia Src. **Tomado de Bachir *et al.*, 2017.**

Discusión general y conclusiones

Se sabe que el alto contenido de citoesqueleto (1) asegura el mantenimiento de la estructura discoide de las plaquetas en reposo en la circulación, (2) promueve los cambios profundos de la forma durante la formación de pseudópodos y lamellipodios en la adhesión plaquetaria y activación, (3) media la conversión hacia la forma redondeada, con la liberación de micropartículas durante la respuesta procoagulante plaquetaria y (4) permite que el trombo creciente resista las elevadas fuerzas de cizallamiento en la circulación arterial (Burkhart et al., 2014).

Así mismo de los estudios por inmunofluorescencia indirecta (IFI) del presente trabajo, para estudiar la interacción de Gal-1p exógena con sus ligandos en plaquetas tanto en reposo como activadas con Tr, fue posible dilucidar interacciones con Ta y otras proteínas de la MEC. Los resultados obtenidos indicaron que la Gal-1p desencadenaba la redistribución de la Ta plaquetaria con diferentes patrones. En plaquetas en reposo, se observó un patrón de distribución citoplásmico homogéneo para Ta y Gal-1 endógena. En plaquetas activadas con Tr, pudo comprobarse un cambio de distribución a patrón periférico de ambas moléculas. En la incubación con Gal-1p *per se*, se detectó un cambio parcial a localización periférica de la Ta. En base a estos resultados, proponemos que la Gal-1 endógena podría generar un complejo interactivo con la Ta y con otras proteínas del citoesqueleto, principalmente con la actina y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Por otra parte, se sabe que la unión de la Ta a un dominio citoplasmático de integrina es crítica para inducir la activación de $\alpha_{IIb}\beta_3$ por agonistas *in vivo* y, que a su vez, un pequeño porcentaje de $\alpha_{IIb}\beta_3$ aparece asociado directamente con filamentos de actina mediando funciones de proteínas celulares (Petrich *et al.*, 2007).

Se sabe que la Ta es una proteína de alto PM (225-235 kDa) que está uniformemente distribuida en el citoplasma de plaquetas en reposo. Se ha demostrado que en plaquetas activadas con Tr, la Ta cambia su localización citoplasmática, trasladándose a la membrana plasmática, interviniendo en la adhesión plaquetaria. Trabajos posteriores han dilucidado que una cantidad significativa de Ta rápidamente se redistribuye hacia la periferia, luego de la activación plaquetaria con agonistas, ubicándose en la región submembranosa e interactuando con la integrina β perteneciente a la $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Goksoy *et al.*, 2008).

La Ta está compuesta por un dominio en forma de varilla flexible y otro globular. El dominio en forma de varilla consiste en hélices α que son ensambladas en haces de 5 hélices cada uno que se unen al

Discusión general y conclusiones

dominio citoplásmico β_3 de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ para inducir la conformación (*swung-out*). Por otro lado, el dominio globular o cabeza contiene un dominio FERM (proteína 4.1, ezrin, radixin, moesina) que comprende 4 subdominios F0, F1, F2 y F3 que se unen a la actina (Galdeen *et al.*, 2007).

A su vez se ha comprobado que el dominio de la cabeza de Ta interactúa con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y dos sitios distintos en el dominio citoplásmico de $\alpha_{IIb}\beta_3$, identificándose como sitios de unión, un dominio de membrana fosfotirosina distal y una segunda región única de la membrana proximal. La unión de Ta a la $\alpha_{IIb}\beta_3$ es suficiente para inducir cambios conformacionales necesarios para la unión al Fb. En plaquetas en reposo, la unión de la Ta a la $\alpha_{IIb}\beta_3$ está limitada por la interacción de la cabeza con el dominio en forma de varilla (Goult *et al.*, 2013).

Esta interacción auto-inhibitoria entre la cabeza y la varilla regularía la función de la Ta y se interrumpiría por la activación, induciendo cambios conformacionales en la Ta. Se han identificado varias proteínas que participarían en la activación de la Ta, como la proteína adaptadora restringida a la hematopoyesis, ADAP, la molécula adaptadora interactuante, Rap1-GTP, la proteína G, G α_{13} y, posiblemente muchas otras. La regulación de la interacción de la Ta con la $\alpha_{IIb}\beta_3$ no se ha dilucidado aún, siendo un blanco de investigación permanente, ya que sería el último paso en la activación de la $\alpha_{IIb}\beta_3$. Por otro lado, se ha descrito una Ta mutante (L325R) que se une al citoesqueleto de actina, pero no logra activar a la $\alpha_{IIb}\beta_3$, demostrando que la unión al citoesqueleto de actina precedería a la activación de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Haling *et al.*, 2011). En consecuencia, la liberación de las restricciones plaquetarias por la activación, permitiría que la Ta se una a $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Trabajos anteriores han demostrado que la polimerización de los filamentos de actina es necesaria para que el Fb se una a la $\alpha_{IIb}\beta_3$. Pero el mecanismo por el cual la actina regula la función de Ta todavía no se ha dilucidado. La Ta se une a ambas, actina G y F, pero estaría ligada a la actina G en el citosol de plaquetas en reposo. Se especula que las fuerzas generadas por la polimerización de la actina durante la activación plaquetaria, podría transmitirse a la Ta, de manera tal que podría desplegarse dependiendo de la fuerza y exponer sitios de unión a la F-actina y a la $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Debido a los resultados de MC relacionados con la actina y de la IFI relacionados con la Ta obtenidos, resulta de interés describir los hallazgos de la interacción Ta-actina en sistemas similares. Recientemente Ciobanasu *et al.* (2014), utilizando la actomiosina reconstituida como complejo,

Discusión general y conclusiones

demonstraron que la proteína 1 que contiene repeticiones de WD (Wdr1), podría ayudar a inducir el desmontaje de filamentos de actina, mediando el *turnover* de la actina y la reorganización del citoesqueleto. Por lo tanto, dicha proteína tendría una función en la modulación de la interacción de la Ta con el citoesqueleto y posteriormente con la $\alpha_{IIb}\beta_3$. A su vez, la Wdr1 también desempeñaría un papel crucial en la activación de las integrinas esenciales para la agregación plaquetaria y la difusión de señales intracelulares, induciendo una retroalimentación positiva que reforzaría la asociación entre la actina-Ta-Vn. En plaquetas Wdr1 hipomórficas, tanto la activación inducida por Ta como su redistribución y asociación en el citoesqueleto se ve alterada, indicando que dicha proteína sería mecanosensible, pudiendo sentir las fuerzas generadas por el estiramiento físico.

Las integrinas son la principal familia de receptores de la superficie celular que actúan mediando la unión de las células a la MEC y juegan un papel clave en la adhesión y agregación plaquetaria. En la introducción describimos integrinas plaquetarias tales como el receptor de Col, $\alpha_2\beta_1$; el receptor de Fn, $\alpha_5\beta_1$; el receptor de laminina, $\alpha_6\beta_1$ y el receptor de Vn, $\alpha v\beta_3$ (Li *et al.*, 2010). A su vez, algunas integrinas sirven también como mediadoras de interacciones celulares involucradas en la adhesión de los leucocitos. Su papel en la adhesión las convierte en elementos esenciales para la agregación plaquetaria, entre otros procesos. A su vez, las porciones extracelulares de las integrinas se unen a componentes de la MEC (Fn, laminina y algunas clases de Col) por reconocimiento de la secuencia RGD. Los receptores de las integrinas juegan un papel decisivo en la organización del citoesqueleto celular de la actina y en la transmisión de señales desde la MEC hacia el interior de la célula. Por otra parte, el contacto entre los componentes de la MEC y el receptor de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ produce agrupamiento de receptores y la formación de adhesiones locales, en donde las integrinas se conectan con los complejos del citoesqueleto intracelular. Las proteínas que se fijan con las integrinas en esas adhesiones locales son Ta, Vn, α -actinina, tensina y paxilina. Una vez ensamblados, los complejos formados por citoesqueleto-integrina funcionarían igual que los receptores activados, reclutando los componentes de los sistemas de señalización intracelular (Bachir *et al.*, 2017).

En el inciso **1.2.4.1.1.3.1** describimos a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, mencionando que mediante la unión a ligandos bivalentes como el Fb y el vWF en la membrana plaquetaria de forma no covalente, produce la agregación plaquetaria. En las plaquetas en reposo, la $\alpha_{IIb}\beta_3$ está presente en una conformación *doblada*

Discusión general y conclusiones

de baja afinidad sobre la superficie celular, y que luego de la activación plaquetaria por agonistas las señales intracelulares inducirían cambios conformacionales, los cuales llevarían al receptor a adoptar una conformación *desplegada o extendida*, con una mayor afinidad de unión para los ligandos (Estevez *et al.*, 2015).

El proceso de cambio de conformación descrito anteriormente se conoce como señalización *inside-out* (señalización desde adentro hacia afuera). Por otro lado, la vinculación del citoesqueleto de actina a $\alpha_{IIb}\beta_3$ durante la activación plaquetaria desempeñaría un papel esencial en los cambios conformacionales de la $\alpha_{IIb}\beta_3$. A su vez la proteína citosólica Ta mediaría esta interacción entre la $\alpha_{IIb}\beta_3$ y el citoesqueleto (Song *et al.*, 2012).

En la introducción también describimos a las *kindlins* como integrinas co-activadoras; sin embargo, el mecanismo por el cual las *kindlins* inducirían la activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sigue siendo un tema de debate. Algunos trabajos han sugerido que las *kindlins* facilitarían la acción de la Ta (Ma *et al.*, 2008). Otros trabajos sugieren que las *kindlins*, a diferencia de la Ta, son indispensables para la unión de la integrina a un ligando monovalente (repetición de la Fn de tipo III), pero se requeriría para la unión a un ligando multivalente el Fb, que posiblemente promovería el agrupamiento de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ye *et al.*, 2014).

Sin embargo, el mecanismo responsable de inducir la unión de la Ta y la *kindlin* a la $\alpha_{IIb}\beta_3$ todavía no está totalmente dilucidado. Existen trabajos que sugieren que la GTPasa Rap1 pequeña desempeñaría un papel importante y sostienen la hipótesis de que Rap1 GTP interactuaría con la molécula adaptadora (RIAM) que podría ser el efector responsable de Rap1, para inducir la unión de la Ta. Pero, a pesar de que RIAM es importante para la función de la integrina leucocitaria, se ha demostrado que la deficiencia de RIAM no afectaría la activación y la función de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetaria (Stritt *et al.*, 2015).

Con respecto al mecanismo de activación plaquetaria, se sabe que el enlace del citoesqueleto de actina con $\alpha_{IIb}\beta_3$ juega un papel esencial en la adhesión a los componentes de la matriz subendotelial y la agregación plaquetaria. Por lo que, daría como resultado la despolimerización y la reorganización en fibras largas de actina F densa, distribuidas en el cuerpo de las plaquetas activadas. El volumen de actina que se pone en juego está altamente regulado, así como también el número de proteínas de unión a

Discusión general y conclusiones

actina que están presentes para mediar el montaje, desensamblaje y reordenamiento del citoesqueleto. Por otro lado, el citoesqueleto de actina está en un dinámico equilibrio entre dos estados, globular monomérica, actina G y filamentosa polimérica, actina F. En las plaquetas en reposo, la actina está presente como una submembrana de corto reticulado de filamentos de actina, conocido como el esqueleto de la membrana. A su vez, las plaquetas contienen cofilina 1, que cambia el giro del filamento de actina F y cortaría a la actina F filamentosa. Esta separación facilitaría la nueva formación de fibras de actina a través de los extremos de púas recién expuestos. Se sabe que la Wdr1 se une al complejo cofilina-F-actina y mejora fuertemente el corte de la cofilina, contribuyendo así al mantenimiento de altas concentraciones de actina en forma monomérica, facilitando la reorganización de la actina (Okreglak & Drubin, 2010).

En base a la bibliografía revisada y los resultados de nuestro trabajo, proponemos que debido a que la actina se encuentra en equilibrio entre las formas monomérica y filamentosa, la Gal-1 se uniría a la forma monomérica, interactuando y facilitando el pasaje del estado de reposo a la activación plaquetaria.

Recientemente Dasgupta *et al.* (2016) demostraron en plaquetas que la Wdr-1 desempeñaría un papel crucial en la activación de integrinas esenciales para la agregación y la difusión. Pero a pesar de los defectos de la Wdr1 hipomórfica en ratones, no se evidencia sangrado espontáneo, lo que indicaría que la polimerización de actina es un proceso versátil que implicaría varios eventos celulares tales como migración, endocitosis y división celular, operando en ellos múltiples vías. Por lo tanto, debido al gran número de proteínas que se unen a la actina y que influyen en estos procesos, la deficiencia de un factor sería fácilmente compensada. El estiramiento producido en las plaquetas expondría sitios de unión críticos para Vn, que reforzarían la asociación de la Ta con el citoesqueleto. Por lo tanto, podríamos pensar que la Gal-1 y distintas moléculas de la MEC interaccionarían y desencadenarían las mismas vías metabólicas intracelulares, como las vías de activación de la MAPK, de la PI₃K y de la PKC. A su vez, la conexión mecánica entre los receptores de las integrinas y el sistema de señalización del citoesqueleto consistiría en una transformación de la fuerza mecánica en señales bioquímicas. De esta manera, y por los resultados hallados en nuestro trabajo, relacionados con los de otros trabajos similares tales como el de Pacienza *et al.* (2008), sabemos que la Gal-1 produce activación plaquetaria al interaccionar con la

Discusión general y conclusiones

integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, jugando de esta manera un rol decisivo en la organización del citoesqueleto celular de la actina y en la transmisión de señales desde la MEC hasta el interior de la célula.

En cuanto a la detección de galectinas solubles en plasma humano, se ha detectado la presencia de Gal-3 y su aumento en pacientes con cáncer gastrointestinal, de ovario, melanoma y linfoma no Hodgkin. Estos resultados sugerirían que la Gal-3 en circulación tendría un rol importante en la progresión del tumor. Por lo tanto existiría la posibilidad de poder usar la concentración de dicha galectina como predicción de futuras metástasis en éstos pacientes (Iurisci *et al.*, 2000).

La Gal-1 está presente en plasma humano en niveles muy bajos (Saussez *et al.*, 2008), por lo que se planteó su purificación. Durante la realización de este objetivo pudimos lograr la purificación y caracterización *parcial* de la Gal-1 plasmática, siendo un hallazgo relevante para entender su participación en procesos de interés clínico, tales como inflamación, trombosis y cáncer.

En trabajos previos demostramos que la Gal-1p interaccionaba con plaquetas humanas en reposo y luego de la activación con Tr (González, 2008; González & Fink, 2009). Siendo la Gal-1p una lectina de gran similitud con la humana, nuestros resultados son comparables con los hallados en particular con plaquetas por otros autores, con otras Gal-1 de diferentes especies, demostrando que producen agregación en relación dosis-dependiente. Por ejemplo, Timoshenko *et al.* (2003) evidenció dicho comportamiento utilizando Gal-1 bovina.

La contribución de las plaquetas a la respuesta inflamatoria es un resultado de su interacción con los leucocitos y con las células endoteliales. Las plaquetas activadas expresan en su superficie P-selectina y CD40L, proteínas almacenadas en los gránulos α que permiten el reclutamiento y la activación de leucocitos en sitios de lesión vascular, así como la adhesión de las plaquetas al endotelio. La interacción entre los tres tipos de células crea un circuito de retroalimentación mutua de la activación e inhibición recíproca, lo que conduce a la modulación del proceso inflamatorio (Etulain & Schattner, 2014).

Se ha demostrado que tanto la Gal-1, como la Gal-8 pueden desencadenar la activación plaquetaria y promover la formación de agregados plaqueta- leucocitos, sugiriendo un nuevo mecanismo de formación del trombo mediada por interacciones galectina-glicanos (Romaniuk *et al.*, 2011).

Discusión general y conclusiones

La adhesión y migración de células inflamatorias a través de la membrana basal y la MEC es un proceso complejo, constituido por múltiples etapas y coordinado por un amplio espectro de glicoproteínas, enzimas, quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, las galectinas se secretan al microambiente extracelular, en donde reconocen terminales oligosacáridicos de poli-N-acetil-lactosamina en componentes principales de la MEC, tales como laminina y Fn. En función del reconocimiento específico de estas glicoproteínas extracelulares, las galectinas han sido postuladas como poderosos agentes moduladores de las interacciones entre células y la MEC. La Gal-1 reveló efectos antagónicos respecto a su capacidad de promover o inhibir la adhesión de células a la MEC, dependiendo de la estirpe celular involucrada, su estado de activación y su estadio de diferenciación. A su vez, se ha demostrado que la rGal-1h (en concentraciones inferiores al umbral apoptótico crítico) ejerce un efecto inhibitorio específico sobre la adhesión de células T activadas a la MEC y a sus componentes individuales. Este efecto fue dependiente del CDR y selectivo de acuerdo al sustrato de adhesión (Fn > laminina > Col-IV). La investigación de los mecanismos involucrados en este efecto anti-adhesivo reveló una inhibición de la re-organización del citoesqueleto celular dependiente de actina y bloqueo de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en el contexto de la MEC. En base a estos resultados, se ha postulado un modelo hipotético de acción de Gal-1, en el cual se explica que ante una respuesta inmune exacerbada o episodios inflamatorios, la Gal-1 sería secretada por células T, macrófagos y células accesorias en concentraciones fisiológicas. Esta proteína se comportaría como un *punte* uniéndose con un extremo CDR proteínas de la MEC (Fn y laminina) y con el otro su contrarreceptor en células T. Por lo tanto, contribuiría a regular negativamente la adhesión de células T activadas a la MEC y membranas basales (Rabinovich *et al.*, 1999).

La adhesión plaquetaria a la MEC en los sitios de lesión vascular representa un paso clave para limitar el sangrado. Bajo esfuerzo de cizalladura como el que se encuentran en las venas y arterias más grandes, la adhesión a la pared del vaso implica principalmente la unión a Col fibrilar, Fn y laminina. Sin embargo, en condiciones de elevación del esfuerzo de cizallamiento, la adhesión firme de las plaquetas al subendotelio expuesto está mediada por la interacción de las plaquetas al complejo GP Ib/IX/V y al subendotelio unido al vWF (Berndt *et al.*, 2014).

Discusión general y conclusiones

Por otra parte, se ha observado que en ratones deficientes en vWF se retrasaba la formación de trombos arteriales, por lo que se sugirió que bajo estas condiciones, la GPIb α podría ayudar a otros ligandos a mediar la adhesión plaquetaria. Además, los estudios *in vitro* han demostrado que las Gal-8 y -1 promoverían la adhesión de las plaquetas y la propagación. Por otro lado, la GPIb α fue identificada como un contra-receptor funcional de la Gal-8 (Romaniuk *et al.*, 2010).

Por lo tanto, se podría proponer que las galectinas actuarían directamente como sustrato o comportarse como proteínas matricelulares que se unen al complejo plaquetario GPIb/IX/V contribuyendo así a la adhesión plaquetaria a la MEC. La capacidad de las plaquetas para formar un trombo depende de su capacidad de agregación. Después de la adhesión plaquetaria al endotelio lesionado, agonistas solubles tales como ADP, serotonina, Tr y TxA₂, producido/liberado en el sitio de lesión actuarían en forma autocrina y parácrina para amplificar la activación plaquetaria y reclutar las plaquetas al trombo en desarrollo (Shattil *et al.*, 2010).

Tanto la Gal-1 soluble como la -8 promueven la transición de la integrina $\alpha_{Ib}\beta_3$ de un estado de baja afinidad (estado de reposo) a un estado de alta afinidad (estado activo), lo que resulta en el desenmascaramiento de neoepitopes en esta integrina, y esto permitiría la unión del Fb que actuaría como una molécula puente entre las plaquetas para formar agregados (Romaniuk *et al.*, 2010, Pacienza *et al.*, 2008).

A su vez, tanto la Gal-1 como la 8 inducen la agregación plaquetaria en plasma, lo que indica un papel relevante de estas lectinas en medios fisiológicos. Aunque la agregación celular fue una de las primeras actividades descritas para estas lectinas, este efecto sobre las plaquetas sólo se observó a altas concentraciones de Gal-1 y -8. La agregación plaquetaria a concentraciones más bajas está ausente en plaquetas fijadas, en presencia de agentes quelantes de calcio, o eptifibatida (un antagonista de $\alpha_{Ib}\beta_3$), lo que implicaría que la respuesta de las plaquetas mediada por las galectinas podría relacionarse con la activación celular o un efecto de agrupamiento de receptores de la superficie plaquetaria, dependiendo de su concentración (Romaniuk *et al.*, 2010, Pacienza *et al.*, 2008).

Coincidentemente con estos hallazgos, previamente a este trabajo nosotros obtuvimos resultados similares con la Gal-1p, demostrando que interaccionaba con las plaquetas humanas induciendo agregación dependiente de la concentración de lectina. Los resultados obtenidos por citometría de flujo

Discusión general y conclusiones

(CF) e IFI en plaquetas en reposo, adicionadas con concentraciones crecientes de Gal-1 demostraron que la interacción lectina/receptor también era concentración dependiente. A su vez, cuando se agregaba Gal-1p a plaquetas humanas incubadas previamente con Tr, el número de receptores detectados aumentaba con respecto a las plaquetas expuestas únicamente a la misma concentración de lectina. Estos resultados sugerían que la activación plaquetaria con Tr favorecería sinérgicamente la interacción Gal-1/receptor de membrana plaquetaria (González, 2008).

Por otro lado, a pesar de que tanto Gal-1 como Gal-8 fueron capaces de promover la agregación, la Gal-8 fue 10 veces más potente que la Gal-1 en este efecto estimulante. Aunque la estructura dimérica de la Gal-8 anticiparía un efecto más robusto de estas galectinas en comparación con la Gal-1, la observación de que sólo el dominio N-terminal fue capaz de activar a las plaquetas indicaría que la lectina bivalente no es esencial para promover los efectos de activación sobre las plaquetas (Romaniuk *et al.*, 2010).

Por lo tanto, las diferencias en la concentración requerida para lograr un efecto similar podría reflejar diferentes señales moleculares activadas para cada galectina. La formación inicial del trombo plaquetario es rápidamente reforzada por la generación y liberación de TxA₂ de plaquetas y ADP, que actúan de manera parácrina y autócrina promoviendo la activación plaquetaria. Ambas moléculas son generadas por la estimulación plaquetaria producida por Gal-1 y -8. Además, aunque la respuesta de agregación se desencadenó por concentraciones bajas de Gal-8, fue inhibida en presencia de aspirina (inhibidor de la ciclooxigenasa) y/o un ADP-*scavenger*, obteniéndose una respuesta completa a altas concentraciones, indicando que la Gal-8 es un agonista fuerte que activaría a las plaquetas independientemente de la formación de TxA₂ o de la liberación de ADP (Romaniuk *et al.*, 2010).

Dado los efectos descritos de la Gal-1 y la -8 en la fisiología plaquetaria, la exposición de estas lectinas endógenas en el subendotelio o en células endoteliales activadas desencadenaría la adhesión plaquetaria, la difusión y la formación de trombos. Además, en el sistema vascular las plaquetas serían otra fuente de Gal-8, que sería accesible después de la activación plaquetaria para promover un crecimiento adicional del trombo. En apoyo de esta hipótesis, la evaluación de la hemostasia *in vivo* reveló un aumento en el tiempo de sangrado en animales knockout para Gal-1 que no estaba asociado al recuento plaquetario. Además, las plaquetas deficientes en Gal-1 presentaron cinética alterada de la

Discusión general y conclusiones

retracción del coágulo y el *spreading* plaquetario sobre Fb en presencia de expresión de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ normal. Las plaquetas deficientes en Gal-1 mostraron normalidad en la secreción de gránulos α y la agregación plaquetaria normal. Por lo tanto, Gal-1 regularía el *outside-in* de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que señala acontecimientos en plaquetas y es necesaria para la hemostasia primaria normal *in vivo* (Romaniuk *et al.*, 2012). Quedaría por dilucidar aún si este efecto es específico para la Gal-1 o es una característica general de todas las galectinas.

Dado el papel central de la Gal-1 y -8 en la progresión tumoral, podría ser concebible que la activación plaquetaria fuera inducida por galectina pudiendo contribuir a la patogénesis de la trombosis en pacientes con cáncer. Aunque el mecanismo de la agregación celular mediada por Gal-1- mucina 1 no se ha resuelto por completo, es probable que sea similar al de la Gal-3. La Gal-3 media la agregación celular uniendo el antígeno TF expresado sobre la mucina 1. Se monitoreó la unión de Gal-3 a la mucina 1 en la línea celular de cáncer de colon humano HT-29 por MC, revelando que la interacción de Gal-3 con la mucina 1 está polarizada en la superficie celular. La mucina 1 se agruparía sobre la superficie de la célula, exponiendo moléculas de adhesión previamente ocultas por la proteína transmembrana (Yu *et al.*, 2007).

Recientemente, el grupo de trabajo de Cousin, trabajando con dendrímeros unidos a lactosa, demostró que los mismos nucleaban la formación de agregados de Gal-1, siendo notablemente homogéneos. A su vez, cuando dichos agregados se añadían a la célula *in vitro*, proporcionaban una alternativa vinculante con la MEC que alteraba los procesos de la superficie celular (Cousin & Cloninger, 2015).

Se sabe que la Gal-1 se adhiere a las células cancerígenas a través de la MEC. Como describimos previamente, la laminina, la Fn y otras glicoproteínas presentes en la membrana proveerían los epitopes necesarios para la interacción entre la Gal-1 y la MEC (Elola *et al.*, 2007).

Mientras que el rol de la Gal-1 en el interior celular suele ser independiente de su actividad de lectina, sus funciones extracelulares dependen de la unión a unidades de *N*-acetil lactosamina presentes en glicoconjugados de la superficie (Liu & Rabinovich, 2005).

Varios trabajos ampliaron recientemente las funciones de las galectinas en el sistema inmune, incluyendo la supervivencia de células T efectoras, el destino biológico de las células dendríticas, la

Discusión general y conclusiones

polarización de los macrófagos, el control de las células T reguladoras y la angiogénesis (Crocì et al., 2014b). En los últimos años se ha comprobado que la actividad inmunosupresora de Gal-1 también se ha extendido a la diferenciación y expansión de CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ y Treg (Dalotto-Moreno *et al.*, 2013) de manera similar a otras galectinas, controlando la retención a la superficie celular y los umbrales de señalización de un número de receptores glicosilados. Sin embargo, su actividad inmunorreguladora no se limita a poblaciones de células T, debido a que promovería también la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas (tDC) y controlaría la emigración de inmunógenos tisulares, pero no tDC (Thiemann *et al.*, 2015).

Los efectos tolerogénicos inducidos por Gal-1 han sido confirmados, debido a que inducía tanto a tDC en el cáncer de pulmón, así como también la inducción de células T reguladoras. Por otro lado, además de sus efectos inhibidores inmunes, Gal-1 puede también favorecer el desarrollo de tumores y la progresión a través de la promoción de la angiogénesis tumoral, favoreciendo la señalización del VEGF y la promoción de la proliferación endotelial celular, la adhesión, la migración y la resistencia a la apoptosis. La expresión de galectinas es baja en células vírgenes y en reposo del sistema inmune pero aumenta considerablemente luego de un estímulo de activación y/o diferenciación, como en el caso de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados. Sin embargo, se sabe 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. Los glicanos que contienen cadenas de polilactosamina [(Gal β 1,4GlcNAc)_n], tales como la laminina, la Fn, 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, como describimos previamente. 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 (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

A su vez, las galectinas en solución pueden formar especies multivalentes en un equilibrio dependiente de la concentración. Por otro lado, recordemos que las galectinas de *tipo proto* se asocian

Discusión general y conclusiones

como dímeros unidos de forma no covalente a través de una interfase hidrofóbica, mientras que la Gal-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 del 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 las galectinas mediado por *rafts* (balsas) de lípidos que modulan el recambio de receptores endocíticos señalizan vías de transducción que conducen a la activación de células T, secreción de citocinas, apoptosis, maduración de células B, activación, tolerancia, activación de neutrófilos que conduciría a la fagocitosis, estallido oxidativo y liberación de proteasas y citoquinas (Garner & Baum, 2008).

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. Por otro lado, los complejos lectina-glicano se encargarían también de regular los receptores de la superficie celular y la capacidad de respuesta del receptor a los agonistas, así como también el control de la rotación de receptores (Elola *et al.*, 2015). Además, se han demostrado funciones esenciales para las interacciones Gal-1-glicano en el control inmunológico y vascular, incluyendo la supervivencia de células T efectoras, el destino biológico de las células dendríticas, la polarización de los macrófagos, el control de las células T reguladoras y la angiogénesis. A su vez, la Gal-1 contribuye a la adhesión heterotípica de las células tumorales y de las células endoteliales a la matriz extracelular, las etapas críticas durante las primeras etapas de la invasión tumoral y metástasis (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

A su vez, como vimos previamente, dentro del compartimento intracelular la Gal-1 interactúa con el trifosfato de guanosina oncogénico H-Ras- (H-Ras-GTP) a través de su grupo farnesilo, mejorando la transformación mediada por H-Ras mediante la señalización de ERK1/2. Se sabe que inhibe el crecimiento celular y la activación de células T y promueve la apoptosis de células T activadas. Hallazgos similares se observaron en modelos de glioblastoma. Como mencionamos en la sección **1.1.4.** de la Introducción, se demostró el vínculo entre la expresión de la Gal-1 y la invasión celular del cáncer pancreático, evidenciando la interacción directa entre el tPA y Gal-1 en las células cancerosas

Discusión general y conclusiones

pancreáticas y los fibroblastos del estroma que rodean al tumor. Esta interacción potenciaría la actividad proteolítica del tPA y aumentaría la migración celular e invasión. El agotamiento de la Gal-1 induciría a la acumulación perinuclear de la proteína PKC ϵ y vimentina en células de glioblastoma. Esto afectaría el tráfico de integrinas y el reciclado hacia la membrana celular, dando lugar a una disminución de los receptores de integrinas en los puntos de adhesión de la membrana celular (Fortin *et al.*, 2010).

Blanchard *et al.* (2016) han realizado una revisión bibliográfica reciente, en la cual investigaron la inhibición de la Gal-1, así como también la inhibición de las galectinas en general, y han encontrado que básicamente se logra a través de tres tipos diferentes de inhibidores.

Por lo tanto, los inhibidores de la Gal-1 reportados hasta la fecha son carbohidratos monovalentes y multivalentes e inhibidores peptidomiméticos. El uso de soportes mono- y disacáridos ha dado lugar a inhibidores de alta afinidad de la Gal-1, pero el progreso general es lento en comparación con el desarrollo de inhibidores de Gal-3. Los inhibidores multivalentes explotan la naturaleza inherente de galectinas como reticulantes de glicanos, utilizando glicodendrimeros sintéticos y extractos naturales de polisacáridos. Se han presentado varias patentes con respecto a extractos de polisacáridos y los ensayos clínicos tempranos muestran efectos adversos limitados. Tanto los inhibidores de la Gal-1 monovalentes como multivalentes y las galectinas en general carecen de selectividad debido a la secuencia de conservación dentro de los CDR de galectina, aunque los inhibidores monovalentes basados en sacáridos muestran mejor selectividad (Blanchard *et al.*, 2016).

Como describimos anteriormente, la Gal-1 actuaría principalmente como regulador negativo de la inmunidad al destruir selectivamente células T activadas y por lo tanto podría utilizarse como una molécula terapéutica potencial para enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Los polipéptidos desarrollados son más potentes que la Gal-1 nativa, demostrado por ensayos de hemoaglutinación, induciendo apoptosis en timocitos y células T activadas de manera más potente. Aunque la administración intacta de proteínas todavía sufre problemas de farmacocinética, el uso de nanopartículas, la terapia génica y los conjugados estabilizadores tales como el polietilenglicol (PEG) podrían ayudar a superar dichos problemas debido a que daría como resultado una mejora de los inconvenientes fisicoquímicos generales de las formulaciones de polipéptidos, prolongando la semivida en el suero, siendo uno de los factores limitantes en las formulaciones de proteínas no modificadas, así

Discusión general y conclusiones

como proporcionando protección contra el sistema inmune del huésped. Por otro lado, el tratamiento a través de la terapia génica de Gal-1 se aplicó en artritis inducida por colágeno para evaluar sus efectos *in vivo* en pacientes con artritis reumatoidea. Una única dosis de fibroblastos fabricados por ingeniería genética que secretan Gal-1, al inicio de la enfermedad, fue suficiente para detener la progresión de la misma. Se observaron efectos similares con la administración de la rGal-1h (Blanchard *et al.*, 2016).

Se tiene conocimiento que la Gal-1 en el equilibrio monómero-dímero y dependiendo de sus estados redox, desarrolla funciones diferenciales. Por lo tanto, para utilizar la Gal-1 como un agente terapéutico, la funcionalidad variable de las formas oxidada y reducida de Gal-1 requeriría el desarrollo de una Gal-1 modificada que permanezca estable como una u otra forma bajo diferentes ambientes biológicos. Un enfoque utilizado mientras se trataba la sensibilidad de la Gal-1 a los ambientes oxidados fue la generación de una Gal-1 mutante con una cisteína menos. Se encontró que este mutante era más estable que el tipo de proteína salvaje y conservó su actividad de hemoaglutinación después del almacenamiento sin agentes reductores. Esto también es importante, ya que el uso de productos químicos para retener la integridad funcional y estructural de la rGal-1h podría tener efectos adversos sobre los ensayos celulares, así como el uso de sustancias químicas podría sensibilizar las células y causar interferencia en el resultado del ensayo. El mutante sin cisteína no mostró diferencia estructural significativa en comparación con el tipo salvaje de Gal-1 y también fue eficaz en la inhibición del crecimiento celular (Nishi *et al.*, 2008).

Las lectinas en general no son dianas de inhibición ideales debido a que tienen ranuras dominadas por interacciones electrostáticas dentro de sus sitios de unión. Las galectinas presentan una dificultad adicional, ya que sus sitios de unión a carbohidratos se encuentran altamente conservados con respecto a la secuencia de aminoácidos, lo que limita el potencial de los inhibidores selectivos. A pesar de estas dificultades, se han producido mejoras importantes en la afinidad y selectividad de los inhibidores a base de sacáridos modificados. Se han descrito como inhibidores de la Gal-1 a una serie de inhibidores de afinidad nanomolar basada en tiodigalactósidos (TDG). El estudio tuvo éxito al cambiar la selectividad de las moléculas de Gal-3 hacia las de Gal-1, pero se podría utilizar el mismo fármaco basado en la misma estructura pero con una metodología de diseño para desarrollar inhibidores selectivos y ávidos para la Gal-1 (Van Hattum *et al.*, 2013).

Discusión general y conclusiones

Se ha demostrado que los glicodendrimeros lactosilados y otros derivados de amino-lactulosa muestran una mayor afinidad por Gal-1, pero siguen siendo no selectivos. Para aprovechar todo el potencial de oligodendrimeros y para inducir selectividad y potencia, el perfil de glicano del estado patológico debe ser conocido e imitado por los inhibidores, como puede verse en los resultados de los ensayos de competición, que difieren cuando se utilizan diferentes matrices. Además, el patrón de reconocimiento de glicanos de las galectinas del tipo proto y tándem-repetición necesita ser mejor conocido con el fin de seleccionar Gal-1 sobre otros. Además, los ensayos comúnmente determinan que la eficiencia del ligando no es infalible, con resultados que no siempre se repiten de un ensayo a otro, y además existe la necesidad de un informe del perfil de especificidad para cada ligando (Blanchard *et al.*, 2016).

Actualmente, la estrategia de inhibición más avanzada de la Gal-1 es el uso de polisacáridos modificados, tales como GM-CT-01 y GCS-100, que están siendo probados en ensayos clínicos de fases I y II. Es importante destacar que se han desarrollado dos polisacáridos de este tipo que han demostrado éxito en ensayos clínicos, a saber, GM-CT-01 (Davanat) y GR-MD-02 (Blanchard *et al.*, 2014a, 2014b).

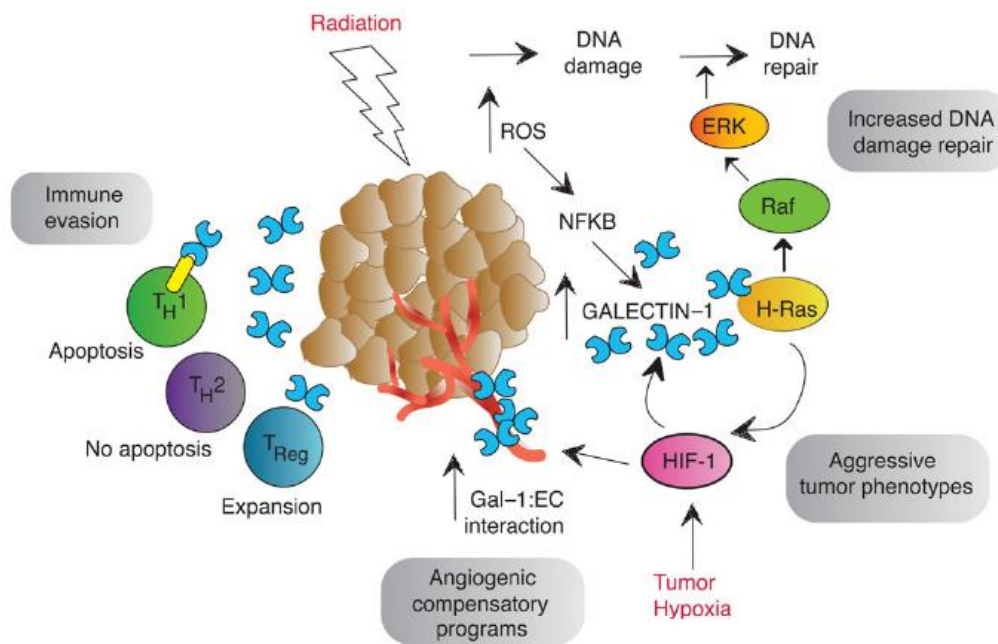
Se ha diseñado un péptido sintético, Anginex (ANIKLSVQMKLFKRHLKWKIIVKLNDGRELSLD), utilizando principios básicos de plegado con secuencias cortas de las regiones de hoja β de las proteínas anti-angiogénicas PF4 e IL-8. Dependiendo de su concentración, el péptido cambia entre una forma globular y una estructura rígida hoja β , pero la forma activa se ha dilucidado que es la hoja β . El mecanismo de acción de Anginex comienza en el plasma, luego interacciona con la Fn para llegar a sitios angiogénicos, donde puede interactuar con CE activadas. El objetivo celular de Anginex ha demostrado ser la Gal-1, que puede inducir la unión célula-célula de la CE. El bloqueo de Gal-1 en la superficie de la CE da lugar a la apoptosis y por lo tanto a un decrecimiento en la vascularización del tumor, que conduce a un crecimiento más lento y una disminución de la oxigenación. Además de ser un potente inhibidor del crecimiento tumoral por sí solo, se ha demostrado que Anginex puede trabajar sinérgicamente con una serie de otras terapias, incluyendo irrofulven, carboplatino, angiostatina y radiación. El uso de Anginex junto con la radioterapia programada se presentó para ser patentado hace más de diez años, en base a los resultados experimentales que muestran que Anginex sensibiliza a las CE a la radioterapia y que la terapia

Discusión general y conclusiones

combinada daría lugar a efectos sinérgicos de disminución de la angiogénesis y del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Mayo *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que ocurre la inducción de Gal-1 por hipoxia a través de un mecanismo dependiente del factor nuclear kB, complejo proteico que controla la transcripción del ADN en la mayoría de las células animales (NFkB) e independiente del factor inducible por hipoxia (HIF) en el sarcoma de Kaposi. La inhibición de HIF1 α y HIF2 α en estas células tumorales no previenen la *up*-regulación de Gal-1 por hipoxia. El LGALS1 humano contiene varios sitios de consenso NFkB y la expresión de un super-represor (IkB-a-SR) o inhibidor farmacológico (BAY-117802) previene la inducción de la hipoxia por Gal-1. Además, la expresión mediada por NFkB de Gal-1 bajo hipoxia fue activada por ROS y la eliminación de N-acetilcisteína de ROS inhibió la inducción de hipoxia de Gal-1 (Crocì *et al.*, 2012).

La radiación es también un potente inductor de Gal-1 en glioma y CEs *in vitro*, regulando en forma positiva a la Gal-1, además de la hipoxia. Esta evidencia creciente sugiere que el tumor y CE pueden utilizar a la Gal-1 para atenuar la respuesta a la radiación tumoral (**Fig. 6.3**) (Kuo & Le, 2014).



Discusión general y conclusiones

Figura 6.3. Gal-1 modula la respuesta del tumor a la radiación. Gal-1 aumenta la expresión en presencia de la hipoxia y después de la irradiación del tumor. Esta elevación de Gal-1 aumenta la reparación del daño inducido del ADN por la radiación a través de la señalización H-Ras, promoviendo la supervivencia celular. La interacción HIF-1/Gal-1/H-Ras puede formar un feedback positivo promoviendo la actividad transcripcional de HIF-1 para conducir fenotipos tumorales agresivos y resistentes a la radiación. La hipoxia también aumenta la unión de Gal-1 a CE para mediar la señalización pro-angiogénica. La Gal-1 también induce la apoptosis de las células T efectoras, mientras que promueve la expansión de Treg para crear un sitio inmunológicamente privilegiado. **Tomado de Kuo & Le, 2014.**

Se ha corroborado que una infusión combinada de Anginex con una dosis de radiación subóptima actuaría sinérgicamente tanto en tumores de ovario humano como también en tumores mamarios, en comparación a las terapias por separado. La mejora de la respuesta a la radiación por Anginex también fue observada en carcinoma escamoso SCCVII y mieloma múltiple focal utilizando modelos de ratones. La reparación de daños al ADN se produce a través de la señalización Raf-1. Gal-1 interactúa con H-Ras y su sobreexpresión potencia a Raf-1 y la fosforilación de ERK1 promueve la reparación del daño producido por radiación al ADN. La radiación estimulada por la expresión de Gal-1 tumoral puede teóricamente aumentar la eficacia de la reparación del daño del ADN, promoviendo la supervivencia al tumor y a las CE a través de la señalización H-Ras. Por otro lado, se sabe que existe una interacción entre H-Ras y HIF1, proporcionando un posible *feedback* positivo HIF1/Gal-1 donde la señalización HIF1 bajo hipoxia puede ser mejorada por Gal-1, la cual actuaría a través de H-Ras para promover la actividad transcripcional de HIF1. Los tumores pueden utilizar esta retroalimentación positiva para mantener la expresión elevada de Gal-1 y la señalización HIF1 para conducir a la radiorresistencia y a los fenotipos agresivos del tumor (Huang *et al.* 2012).

Actualmente, las formulaciones se basan en el recubrimiento de la galectina para mejorar la fijación y absorción celular. Por lo tanto, aprovechando la ventaja de la propiedad anti-angiogénica de las nanopartículas de oro, las cuales presentan propiedades inhibitorias del VEGF, se ha conjugado la Gal-1 a nanopartículas de oro de 13 nm mediante adsorción física, siendo luego patentada como un reactivo anti-inflamatorio dirigido a la artritis (Liang *et al.*, 2014).

La revisión bibliográfica realizada sobre plaquetas y galectinas, nos ha dado un amplio panorama de la importancia de las plaquetas y sobre todo de la Gal-1, en la detección, pronóstico y tratamiento de diferentes enfermedades, particularmente de la inflamación, trombosis y el cáncer. Por lo tanto, consideramos relevante el hallazgo de la detección, purificación, caracterización, actividades

Discusión general y conclusiones

biológicas e interacciones de la Gal-1 en plaquetas humanas logradas en este trabajo, estimando que es un aporte importante a las líneas de investigación vigentes.

Conclusiones

En el presente trabajo se logró:

1. Purificar y caracterizar a la Gal-1 plaquetaria:
 - A. Se concluye que co-purifica con la actina (*western blot* y RP-HPLC-MS)
 - B. En el eluato se obtuvo una baja concentración de proteína , $6-10 \times 10^{-12}$ mg/plaqueta
 - C. En el eluato se detecta una baja actividad hemoaglutinante específica (3019 UH/mg) de proteína

2. Mediante MC se corroboró que la Gal-1 esta relacionada con la actina, debido a que cambia su localización intracitoplasmática tras la activación plaquetaria, produciéndose una colocalización parcial periférica

Discusión general y conclusiones

3. Se estudió por IFI la interacción de la Gal-1 exógena con sus ligandos en plaquetas, tanto en reposo como activadas con Tr y Gal-1, concluimos que la Gal-1 desencadenaba la redistribución de la Ta plaquetaria con diferentes patrones, por lo que proponemos que la Gal-1 podría generar un complejo interactivo con la Ta y con otras proteínas del citoesqueleto, principalmente con la actina y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.
4. En cuanto a la purificación de la Gal-1 plasmática, se logró purificar y caracterizar en forma *parcial*, aunque no se logró caracterizar mediante HPLC-MS/MS, pues estaba en muy baja concentración.

7. Bibliografía

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 Apr 1; 259(1):291-4.
- Adler DH, Cogan JD, Phillips JA 3rd, Schnetz-Boutaud N, Milne GL, Iverson T, Stein JA, Brenner DA, Morrow JD, Boutaud O, Oates JA. Inherited human cPLA (2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J Clin Invest.* 2008 Jun; 118(6):2121-31.
- 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 Sep;14(9):817-825. Epub 2004 May 17.
- Ahmed H, Fink NE, Vasta GR. Elasmobranch and teleost fish contain thioldependent beta-galactoside-binding lectins that are cross-reactive with those identified and characterized in bovine spleen. *Ann N Y Acad Sci.* 1994, 15; 712:318-20.
- Ahmed H, Pohl J, Fink NE, Strobel F, Vasta GR. The primary structure and carbohydrate specificity of a β -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.
- Ambrosio AL, Boyle JA, Di Pietro SM. Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood.* 2012 Nov 8; 120(19):4072-81.
- Andre S, Kaltner H, Furuike T, Nishimura S and Gabius HJ. Persubstituted cyclodextrin-based glycoclusters as inhibitors of protein-carbohydrate recognition using purified plant and mammalian lectins and wild-type and lectin-gene-transfected tumor cells as targets. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 87-98.

Bibliografia

- Arman M, Krauel K. Human platelet IgG Fc receptor Fc γ RIIA in immunity and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2015 Jun; 13(6):893-908.
- Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Neuzillet C, Albert S, Raymond E, Faivre S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014 Mar; 40(2):307-19. Review.
- Bachir AI, Horwitz AR, Nelson WJ, Bianchini JM. Actin-Based Adhesion Modules Mediate Cell Interactions with the Extracellular Matrix and Neighboring Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Jul 5; 9(7).
- Bacigalupo ML, Carabias P, Troncoso MF. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World J Gastroenterol.* 2017 Aug 7; 23(29):5266-5281. Review.
- Bacigalupo ML, Manzi M, Espelt MV, Gentilini LD, Compagno D, Laderach DJ, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Galectin-1 triggers epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2015 Jun; 230(6):1298-309.
- Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, Troncoso MF. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013 Dec 21; 19 (47):8831-49.
- Badolia R, Kostyak JC, Dangelmaier C, Kunapuli SP. Syk Activity Is Dispensable for Platelet GP1b-IX-V Signaling. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 9; 18(6).
- Barbier M, Faille D, Lloriod B, Textoris J, Camus C, Puthier D, Flori L, Wassmer SC, Victorero G, Alessi MC, Fusaï T, Nguyen C, Grau GE, Rihet P. Platelets alter gene expression profile in human brain endothelial cells in an in vitro model of cerebral malaria. *PLoS One.* 2011; 6(5):e19651.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 1994b Feb 25; 76(4):597-8.

Bibliografía

- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994a Aug 19; 269(33):20807-10. Review.
- Barondes SH. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annu Rev Biochem*. 1981; 50:207-31. Review.
- Barrientos G, Freitag N, Tirado-González I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL, Blois SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update*. 2014 Mar-Apr; 20(2):175-93.
- Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 2011 Aug 4; 118(5):1359-69.
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Seilhamer JJ. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *Baum J Exp Med*. 1995 Mar 1; 181(3):877-87.
- Belanis L, Plowman SJ, Rotblat B, Hancock JF, Kloog Y. Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters. *Mol Biol Cell*. 2008 Apr; 19(4):1404-14.
- Benatar AF, García GA, Bua J, Cerliani JP, Postan M, Tasso LM, Scaglione J, Stupirski JC, Toscano MA, Rabinovich GA, Gómez KA. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct 9; 9(10):e0004148.
- Berlanga O, Tulasne D, Bori T, Snell DC, Miura Y, Jung S, Moroi M, Frampton J, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem*. 2002 Jun; 269(12):2951-60.
- Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia*. 2014 May; 20 Suppl 4:15-22. Review.

Bibliografija

- Biswas S, Xin L, Panigrahi S, Zimman A, Wang H, Yakubenko VP, Byzova TV, Salomon RG, Podrez EA. Novel phosphatidylethanolamine derivatives accumulate in circulation in hyperlipidemic ApoE^{-/-} mice and activate platelets via TLR2. *Blood*. 2016 May 26; 127(21):2618-29.
- Blanchard H, Taha AY, Cheon Y, Kim HW, Turk J, Rapoport SI. iPLA2 β knockout mouse, a genetic model for progressive human motor disorders, develops age-related neuropathology. *Neurochem Res*. 2014a Aug; 39(8):1522-32.
- Blanchard H, Yu X, Collins PM, Bum-Erdene K. Galectin-3 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2014b Oct; 24(10):1053-65. Review.
- Blanchard H, Bum-Erdene K, Bohari MH, Yu X. Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2016 May; 26(5):537-54. Review.
- Blaževič O, Mideksa YG, Šolman M, Ligabue A, Ariotti N, Nakhaeizadeh H, Fansa EK, Papageorgiou AC, Wittinghofer A, Ahmadian MR, Abankwa D. Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering. *Sci Rep*. 2016 Apr 18; 6:24165.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007 Jun 1; 129(5):865-77.
- Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N, Owens AP 3rd, Ware J, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*. 2013 Feb; 123(2):908-16.
- Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res*. 2014 Mar 28; 114(7):1174-84.
- Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of Fc γ RIIa as the ITAM-bearing receptor mediating α IIb β 3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood*. 2008 Oct 1; 112(7):2780-6.

Bibliografia

- 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.
- Bresalier RS, Byrd JC, Tessler D, Lebel J, Koomen J, Hawke D, Half E, Liu KF, Mazurek N; Great Lakes-New England Clinical and Epidemiology Center of the Early Detection Research Network. A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer. *Gastroenterology* 2004 Sep; 127(3):741-8.
- Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J Immunol.* 2013 Nov 15; 191(10):5196-203.
- Büchel G, Schulte JH, Harrison L, Batzke K, Schüller U, Hansen W, Schramm A. Immune response modulation by Galectin-1 in a transgenic model of neuroblastoma. *Oncoimmunology.* 2016 Feb 18; 5(5):e1131378.
- Burgers PP, Ma Y, Margarucci L, Mackey M, van der Heyden MA, Ellisman M, Scholten A, Taylor SS, Heck AJ. A small novel A-kinase anchoring protein (AKAP) that localizes specifically protein kinase A-regulatory subunit I (PKA-RI) to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2012 Dec 21; 287(52):43789-97.
- Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012 Oct 11; 120(15):e73-82.
- Burkhardt JM, Gambaryan S, Watson SP, Jurk K, Walter U, Sickmann A, Heemskerk JW, Zahedi RP. What can proteomics tell us about platelets? *Circ Res.* 2014 Mar 28; 114(7):1204-19.
- Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost.* 2016 May; 14(5):918-30. Review.

Bibliografía

- Cagnoni AJ, Pérez Sáez JM, Rabinovich GA, Mariño KV. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer. *Front Oncol.* 2016 May 13; 6:109.
- Camby I, Belot N., Lefranc F., Sadeghi N., de Launoit Y., Kaltner H., Musette S., Darro F., Danguy A., Salmon I., Gabius H.J., and Kiss R. Galectin modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2002; 61: 585-596.
- Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Maurage CA, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Ruchoux MM, Brotchi J, Zick Y, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.* 2001 Jan; 11(1):12-26.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006 Nov; 16(11):137R-157R. Epub 2006 Jul 13. Review.
- Caron M., Bladier D., and Joubert R. Soluble galactoside-binding vertebrate lectins; a protein family with common properties. *Int.J. Biochem.* 1990; 22: 1379-1385.
- Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 2000 Dec 8; 87(12):1141-8.
- Cattaneo V, Tribulatti MV, Carabelli J, Carestia A, Schattner M, Campetella O. Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology.* 2014 Oct; 24(10):966-73.
- Cerecedo D, Cisneros B, Mondragón R, González S, Galván IJ. Actin filaments and microtubule dual-granule transport in human adhered platelets: the role of alpha-dystrobrevins. *Br J Haematol.* 2010 Apr; 149(1):124-36.
- Chadha AS, Kocak-Uzel E, Das P, Minsky BD, Delclos ME, Mahmood U, Guha S, Ahmad M, Varadhachary GR, Javle M, Katz MH, Fleming JB, Wolff RA, Crane CH, Krishnan S.

Bibliografía

- Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol.* 2015 Jul; 54(7):971-8.
- Chen CH, Lo RW, Urban D, Pluthero FG, Kahr WH. α -granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets.* 2017a Mar; 28(2):147-154.
 - Chen J, Losos M, Yang S, Li J, Wu H, Cataland S. Increased complement activation during platelet storage. *Transfusion.* 2017b Jul 3.
 - Chen J, Tang D, Wang S, Li QG, Zhang JR, Li P, Lu Q, Niu G, Gao J, Ye NY, Wang DR. High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumour Biol.* 2014 Mar; 35(3):2513-9.
 - Chen R, Chen X, Salomon RG, McIntyre TM. Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Mar; 29(3):363-71.
 - Chiesa ME. Detección, purificación y posibles roles biológicos de diferentes galectinas porcinas. Tesis Doctoral 2004.
 - Cho MJ, Liu J, Pestina TI, Steward SA, Thomas DW, Coffman TM, Wang D, Jackson CW, Gartner TK. The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A₂, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. *Blood.* 2003 Apr 1; 101(7):2646-51.
 - Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, Danguy A, Louryan S, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Hassid S. 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 Dec 1; 86(11):2353-63.
 - Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat Commun.* 2014; 5:3095.

Bibliografia

- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007 Apr; 13(4):463-9.
- Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, Massaro D. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry.* 1988 Jan 26; 27(2):692-9.
- Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci.* 2014 Jan 15; 127(Pt 2):267-75.
- Collier BS. α IIb β 3: structure and function. *J Thromb Haemost.* 2015 June; 13(Suppl 1): S17–S25.
- Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, Rabinovich GA. Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2013 Apr 1; 2(4):e23565.
- Cooper DN, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol.* 1990 May; 110(5):1681-91.
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000 Sep 14; 407(6801):258-64. Review.
- Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 16; 17(9). Review.
- Cousin JM, Cloninger MJ. Glycodendrimers: tools to explore multivalent galectin-1 interactions. *Beilstein J Org Chem.* 2015 May 12; 11: 739-47.
- Coxon CH, Geer MJ, Senis YA. ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood.* 2017 Jun 29; 129(26):3407-3418. Review.
- Cranmer SL, Ashworth KJ, Yao Y, Berndt MC, Ruggeri ZM, Andrews RK, Jackson SP. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIIb α -filamin interaction. *Blood.* 2011 Mar 3; 117(9):2718-27.

Bibliografía

- Croci DO, Cerliani JP, Pinto NA, Morosi LG, Rabinovich GA. Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology*. 2014b Dec; 24(12):1283-90. Review.
- Croci DO, Rabinovich GA. Linking tumor hypoxia with VEGFR2 signaling and compensatory angiogenesis: Glycans make the difference. *Oncoimmunology*. 2014a Jun 25; 3:e29380.
- Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albini A, Rabinovich GA. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 2012 Oct 22; 209(11):1985-2000.
- Crocker PR, Kannagi R. Introduction to special issue: 'emerging roles of siglecs in health and disease'. *Glycobiology*. 2014 Sep; 24(9):784.
- Czikora A, Lundberg DJ, Abramovitz A, Lewin NE, Kedei N, Peach ML, Zhou X, Merritt RC Jr, Craft EA, Braun DC, Blumberg PM. Structural Basis for the Failure of the C1 Domain of Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 2 (RasGRP2) to Bind Phorbol Ester with High Affinity. *J Biol Chem*. 2016 May 20; 291(21):11133-47.
- Dahlen DD, Broudy VC, Drachman JG. Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. *Blood*. 2003 Jul 1; 102(1):102-8.
- Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res*. 2013 Feb 1; 73(3):1107-17.
- Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res*. 2013 Feb 1; 73(3):1107-17.

Bibliografia

- Dam TK, Brewer CF. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry*. 2008 Aug 19; 47(33):8470-6.
- Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015 Feb; 32:21-7. Review.
- Dasgupta SK, Le A, Da Q, Cruz M, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Wdr1-Dependent Actin Reorganization in Platelet Activation. *PLoS One*. 2016 Sep 14; 11(9):e0162897.
- Delaney MK, Kim K, Estevez B, Xu Z, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ushio-Fukai M, Cho J, Du X. Differential Roles of the NADPH-Oxidase 1 and 2 in Platelet Activation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 May; 36(5):846-54.
- 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 Jan; 68(1):51-9.
- Dias-Baruffi M, Stowell SR, Song SC, Arthur CM, Cho M, Rodrigues LC, Montes MA, Rossi MA, James JA, McEver RP, Cummings RD. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology*. 2010 May; 20(5):507-20.
- Dicke C, Langer F. Pathophysiology of Trousseau's syndrome. *Hamostaseologie*. 2015; 35(1):52-9. Review.
- Drachman JG, Miyakawa Y, Luthi JN, Dahlen DD, Raney A, Geddis AE, Kaushansky K. Studies with chimeric Mpl/JAK2 receptors indicate that both JAK2 and the membrane-proximal domain of Mpl are required for cellular proliferation. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28; 277(26):23544-53.
- Drickamer K, Taylor ME. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr Opin Struct Biol*. 2015 Oct; 34:26-34. Review.

Bibliografía

- Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 2013 Feb 7; 121(6):1008-15.
- Earl LA, Bi S, Baum LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem*. 2010 Jan 22; 285(4):2232-44.
- Elola MT, Fink NE. Further studies on vertebrate S-type lectins: crossreactivity between toad and human lectins. *Biol Res*. 1997; 30(3):99-104.
- Elola MT, Blidner AG, Ferragut F, Bracalente C, Rabinovich GA. Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *Biochem J*. 2015 Jul 1; 469(1):1-16. Review.
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jul; 64(13):1679-700. Review.
- Espelt MV, Croci DO, Bacigalupo ML, Carabias P, Manzi M, Elola MT, Muñoz MC, Dominici FP, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth. *Hepatology*. 2011 Jun; 53(6):2097-106.
- Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C, Cho J, Ruggeri ZM, Du X. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood* 2016 Feb 4; 127(5):626-36.
- Estevez B, Shen B, Du X. Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Jan; 35(1):24-9. Review.
- Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017 Mar; 32(2):162-177.
- Etulain J, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br J Pharmacol*. 2013 Sep; 170(2):255-65.

Bibliografia

- Etulain J, Negrotto S, Tribulatti MV, Croci DO, Carabelli J, Campetella O, Rabinovich GA, Schattner M. Control of angiogenesis by galectins involves the release of platelet-derived proangiogenic factors. *PLoS One*. 2014 Apr 30; 9(4):e96402.
- Etulain J, Schattner M. Glycobiology of platelet-endothelial cell interactions. *Glycobiology*. 2014 Dec; 24(12):1252-9. Review.
- Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, Guidotti L, Zauli G. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec*. 2000 Jan 1; 258(1):90-9.
- 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.
- Fidler TP, Middleton E, Rowley JW, Boudreau LH, Campbell RA, Souvenir R, Funari T, Tessandier N, Boilard E, Weyrich AS, Abel ED. Glucose Transporter 3 Potentiates Degranulation and Is Required for Platelet Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Jun 29.
- Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Núñez L, Bénézech C, Barone F, Hughes CE, Langan SA, Lowe KL, Pollitt AY, Mourao-Sa D, Sheardown S, Nash GB, Smithers N, Reis e Sousa C, Tybulewicz VL, Watson SP. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*. 2012 Feb 16; 119(7):1747-56.
- Flevaris P, Stojanovic A, Gong H, Chishti A, Welch E, Du X. A molecular switch that controls cell spreading and retraction. *J Cell Biol*. 2007 Nov 5; 179(3):553-65.
- Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009 Jan 22; 113(4):893-901.
- Fortin S, Le Mercier M, Camby I, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1 is implicated in the protein kinase C epsilon/vimentin-controlled trafficking of integrin-beta1 in glioblastoma cells. *Brain Pathol*. 2010 Jan; 20(1):39-49.

Bibliografia

- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost.* 2001 Jul; 86(1):214-21. Review.
- Galdeen S.A., Stephens S., Thomas D.D., and Titus M.A. Talin influences the dynamics of the myosin VII-membrane interaction. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18: 4074-4084.
- Garner OB, Baum LG. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec; 36(Pt 6):1472-7.
- Garraud O, Chabert A, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Cognasse F. Platelets and immunity: From physiology to pathology. *Transfus Clin Biol.* 2017 Jun; 24(2):83-86.
- Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1; 99(20):13014-9.
- Getz TM, Dangelmaier CA, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J Thromb Haemost.* 2010 Oct; 8(10):2283-93.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res.* 2013 Mar; 131(3):191-7. Review.
- Giampaolo A, Vulcano F, Macioce G, Mattia G, Barca A, Milazzo L, Ciccarelli C, Hassan HJ. Factor-V expression in platelets from human megakaryocytic culture. *Br J Haematol.* 2005 Jan; 128(1):108-11.
- Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 2004 Jul 15; 117(Pt 16):3415-25. Review.
- 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 Oct; 83(20):7603-7.

Bibliografía

- Goggs R, Williams CM, Mellor H, Poole AW. Platelet Rho GTPases-a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem J.* 2015 Mar 15; 466(3):431-42.
- Goksoy E, Ma YQ, Wang X, Kong X, Perera D, Plow EF, Qin J. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell.* 2008 Jul 11; 31(1):124-33.
- Gong H, Shen B, Flevaris P, Chow C, Lam SC, Voyno-Yasenetskaya TA, Kozasa T, Du X. G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science.* 2010 Jan 15; 327(5963):340-3.
- González MM y Fink NE. Localización inmunohistoquímica de ligandos de galectina-1 en plaquetas humanas. *Medicina* 2006; 66:97–98
- González MM, Fink NE. Galectin-1 in human platelets. 47 th ASH Annual Meeting. American Society of Hematology. Atlanta, Estados Unidos, diciembre 10-14, 2005. *Blood* 2005; 106 (11pt. 1): 5^a-1030^a.
- González MM, Fink NE. Recent studies on human platelets-galectin-1 interactions (Review). *J Argent Chem Soc* 2009; 97(1):234–241
- González MM, Pistaccio L, Fink N. Galectin-1 binding to human platelets. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:S122
- González MM. Tesis de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. Interacción de galectina-1 esplénica porcina con plaquetas humanas; 2008.
- González MM. y Fink NE. Patrón de localización de talina en plaquetas humanas lavadas adicionadas con galectina-1. Acta del congreso: IFCC-WorldLab. 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2008; Brasil. Fortaleza.
- González MM., Yoshizaki L. y Fink NE. Galectina-1, una proteína menor de plaquetas humanas, se aísla como un complejo actina-lectina. Acta del congreso: 53^a Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica 2008; Mar del Plata. Argentina.

Bibliografía

- González MM, Yoshizaki L, Wolfenstein-Todel C, Fink NE. Isolation of Galectin-1 from Human Platelets: Its Interaction with Actin. *Protein J* 2012; 31:8–14.
- Gordge MP. Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol.* 2005 Jun; 145(3):271-3.
- Gorfe AA, Babakhani A, McCammon JA. H-ras protein in a bilayer: interaction and structure perturbation. *J Am Chem Soc.* 2007 Oct 10; 129(40):12280-6. Epub 2007 Sep 19.
- Gould WR, Simioni P, Silveira JR, Tormene D, Kalafatis M, Tracy PB. Megakaryocytes endocytose and subsequently modify human factor V in vivo to form the entire pool of a unique platelet-derived cofactor. *J Thromb Haemost.* 2005 Mar; 3(3):450-6.
- Goult BT, Xu XP, Gingras AR, Swift M, Patel B, Bate N, Kopp PM, Barsukov IL, Critchley DR, Volkman N, Hanein D. Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: implications for talin activation. *J Struct Biol.* 2013 Oct; 184(1):21-32.
- Guardia CM, Gauto DF, Di Lella S, Rabinovich GA, Martí MA, Estrin DA. An integrated computational analysis of the structure, dynamics, and ligand binding interactions of the human galectin network. *J Chem Inf Model.* 2011 Aug 22; 51(8):1918-30.
- Haling JR, Monkley SJ, Critchley DR, Petrich BG. *Blood.* Talin-dependent integrin activation is required for fibrin clot retraction by platelets. 2011 Feb 3; 117(5):1719-22.
- Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J Immunol.* 2010 Mar 1; 184(5):2686-92.
- Hayward CP, Fuller N, Zheng S, Adam F, Jeimy SB, Horsewood I, Quinn-Allen MA, Kane WH. Human platelets contain forms of factor V in disulfide-linkage with multimerin. *Thromb Haemost.* 2004 Dec; 92(6):1349-57.
- Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost.* 2015 Dec; 13(12):2141-51. Review.

Bibliografia

- Heusschen R, Schulkens IA, van Beijnum J, Griffioen AW, Thijssen VL. Endothelial LGALS9 splice variant expression in endothelial cell biology and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb; 1842(2):284-92.
- Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993 Aug; 3(4):297-304. Review.
- Hittelet A, Legendre H, Nagy N, Bronckart Y, Pector JC, Salmon I, Yeaton P, Gabius HJ, Kiss R, Camby I. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer*. 2003 Jan 20; 103(3):370-9.
- Hoffbrand A.V., Moss P.A.H. *Essential Haematology 2016*, 7th Edition.
- Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul; 9 Suppl 1:56-65. Review.
- Huang EY, Chen YF, Chen YM, Lin IH, Wang CC, Su WH, Chuang PC, Yang KD. A novel radioresistant mechanism of galectin-1 mediated by H-Ras-dependent pathways in cervical cancer cells. *Cell Death Dis*. 2012 Jan 12; 3: e251.
- Hughes CE, Finney BA, Koentgen F, Lowe KL, Watson SP. The N-terminal SH2 domain of Syk is required for (hem) ITAM, but not integrin, signaling in mouse platelets. *Blood*. 2015 Jan 1; 125(1):144-54.
- 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 Mar; 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 Mar 15; 252(3):400-7.

Bibliografia

- Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD. Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar; 65(5):728-42.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13; 147(6):1299-312.
- Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul; 5 Suppl 1:18-23.Review.
- Italiano JE Jr.Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Feb; 39(1):15-24. Review.
- Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Apr; 6(4):1389-93.
- Jalal S, Chand K, Kathuria A, Singh P, Priya N, Gupta B, Raj HG, Sharma SK. Calreticulin transacetylase: a novel enzyme-mediated protein acetylation by acetoxy derivatives of 3-alkyl-4-methylcoumarins. *Bioorg Chem.* 2012 Feb; 40(1):131-6.
- Jeschke U, Walzel H, Mylonas I, Papadopoulos P, Shabani N, Kuhn C, Schulze S, Friese K, Karsten U, Anz D, Kupka MS.The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 and shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression and galectin-1 binding. *J Histochem Cytochem.* 2009 Sep; 57(9):871-81.
- Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood.* 2002 Jan 1; 99(1):193-8.
- Jones CI, Sage T, Moraes LA, Vaiyapuri S, Hussain U, Tucker KL, Barrett NE, Gibbins JM.Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 inhibits platelet response to thrombin and von Willebrand factor by regulating the internalization of glycoprotein Ib via AKT/glycogen synthase kinase-3/dynamin and integrin α IIb β 3.*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Sep; 34(9):1968-76.

Bibliografia

- Joubert R., Caron M., Adalid A.V., Mornet D., and Bladier D. Human brain lectin: a soluble lectin that binds actin. *Journal of Neurochemistry* 1992; 58: 200-203.
- Joubert R, Caron M, Bladier D. Investigation on the occurrence of soluble lectins in mammalian nervous tissue extracts. *Comp Biochem Physiol B*. 1986; 85(4):859-63.
- Ju L, Chen Y, Xue L, Du X, Zhu C. Cooperative unfolding of distinctive mechanoreceptor domains transduces force into signals. *Elife*. 2016 Jul 19; 5.
- Ju L, Chen Y, Zhou F, Lu H, Cruz MA, Zhu C. Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Iba in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics. *Thromb Res*. 2015 Sep; 136(3):606-12.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, von Andrian UH. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007 Sep 21; 317(5845):1767-70.
- Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, Chen W, Kutok JL, Rabinovich GA, Shipp MA. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 7; 104(32):13134-9.
- Kadlec B, Skrickova J, Merta Z, Dusek L, Jarkovsky J. The incidence and predictors of thromboembolic events in patients with lung cancer. *ScientificWorldJournal*. 2014.
- Kasirer-Friede A, Kang J, Kahner B, Ye F, Ginsberg MH, Shattil SJ. ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin α IIb β 3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood*. 2014 May 15; 123(20):3156-65.
- Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol*. 2015 Jan; 52(1):4-11.
- Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun; 1044:139-41. Review.

Bibliografía

- Khan A, Li D, Ibrahim S, Smyth E, Woulfe DS. The physical association of the P2Y₁₂ receptor with PAR4 regulates arrestin-mediated Akt activation. *Mol Pharmacol*. 2014 Jul;86(1):1-11
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer*. 2007b Nov 15; 110(10):2339-46.
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost*. 2007a Mar; 5(3):632-4.
- Kim J, Zhang CZ, Zhang X, Springer TA. A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature. *Nature*. 2010 Aug 19; 466(7309):992-5.
- Kimura A, Takahashi M, Choi BY, Bae SW, Hohta S, Sasaoka T, Nakahara KI, Chida K, Sawabe M, Yasunami M, Naruse T, Izumi T, Park JE. Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and myocardial infarction in Japanese and Korean populations. *Tissue Antigens*. 2007 Mar; 69(3):265-9.
- Klapproth S, Moretti FA, Zeiler M, Ruppert R, Breithaupt U, Mueller S, Haas R, Mann M, Sperandio M, Fässler R, Moser M. Minimal amounts of kindlin-3 suffice for basal platelet and leukocyte functions in mice. *Blood*. 2015 Dec 10; 126(24):2592-600.
- Kopitz J, von Reitzenstein C, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, Cantz M and Gabius HJ. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem* 2001; 276: 35917-35923.
- Kordich L, Blanco A, Cerrato G, Quintana I, Vázquez A, Vizcargüenaga MI. Fundamentos para el trabajo práctico en el laboratorio de hemostasia. Buenos Aires: Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis, 2003.
- Koseoglu S, Dilks JR, Peters CG, Fitch-Tewfik JL, Fadel NA, Jasuja R, Italiano JE Jr, Haynes CL, Flaumenhaft R. Dynamin-related protein-1 controls fusion pore dynamics during platelet granule exocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Mar; 33(3):481-8.

Bibliografia

- Kuo P, Le QT. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. *Glycobiology*. 2014 Oct; 24(10):921-5. Review.
- Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, Compagno D. Galectins as new prognostic markers and potential therapeutic targets for advanced prostate cancers. *Prostate Cancer*. 2013; 2013:519436. Review.
- Langer HF, Choi EY, Zhou H, Schleicher R, Chung KJ, Tang Z, Göbel K, Bdeir K, Chatzigeorgiou A, Wong C, Bhatia S, Kruhlak MJ, Rose JW, Burns JB, Hill KE, Qu H, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Wang Y, Simon DI, Nieswandt B, Lambris JD, Li X, Meuth SG, Kubes P, Chavakis T. Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ Res*. 2012 Apr 27; 110(9):1202-10.
- Laurent PA, Séverin S, Hechler B, Vanhaesebroeck B, Payrastre B, Gratacap MP. Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate. *Blood*. 2015 Jan 29; 125(5):881-8.
- Lecine P, Italiano JE Jr, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*. 2000 Aug 15; 96(4):1366-73.
- Leppänen A¹, Stowell S, Blixt O, Cummings RD. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2, 3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18; 280(7):5549-62. Epub 2004 Nov 19.
- Li J, Kim K, Barazia A, Tseng A, Cho J. Platelet-neutrophil interactions under thromboinflammatory conditions. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Jul; 72(14):2627-43. Review.
- Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec; 30(12):2341-9. Review.
- Liang YC, Liu SL. Synthesis and enhanced humidity detection response of nanoscale Au-particle-decorated ZnS spheres. *Nanoscale Res Lett*. 2014 Nov 30; 9(1):647.

Bibliografía

- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol.* 2001 Aug 6; 154(3):485-90.
- Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jan; 5(1):29-41. Review.
- López-Lucendo MF, Solís D, André S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. 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 Oct 29; 343(4):957-70.
- Lova P, Paganini S, Hirsch E, Barberis L, Wymann M, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M.A selective role for phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3; 278(1):131-8. Epub 2002 Oct 28.
- Lucena S, Arocha Piñango CL, Guerrero B. [Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. *Invest Clin.* 2007 Jun; 48(2):249-62. Review.
- Luxenburg C, Heller E, Pasolli HA, Chai S, Nikolova M, Stokes N, Fuchs E. Wdr1-mediated cell shape dynamics and cortical tension are essential for epidermal planar cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2015 May; 17(5):592-604.
- Ma YQ, Yang J, Pesho MM, Vinogradova O, Qin J, Plow EF. Regulation of integrin alphaIIb beta3 activation by distinct regions of its cytoplasmic tails. *Biochemistry.* 2006 May 30; 45(21):6656-62.
- Ma YQ, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol.* 2008 May 5; 181(3):439-46.
- Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Apr; 72(8):1517-36.

Bibliografia

- Malara A, Currao M, Gruppi C, Celesti G, Viarengo G, Buracchi C, Laghi L, Kaplan DL, Balduini A. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells*. 2014 Apr; 32(4):926-37.
- Mancuso ME, Santagostino E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *Br J Haematol*. 2017 Jul; 178(2):209-219.
- Manne BK, Badolia R, Dangelmaier C, Eble JA, Ellmeier W, Kahn M, Kunapuli SP. Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets. *J Biol Chem*. 2015 May 1; 290(18):11557-68.
- Manzi M, Bacigalupo ML, Carabias P, Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Espelt MV, Troncoso MF. Galectin-1 Controls the Proliferation and Migration of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Interaction With Hepatocarcinoma Cells. *J Cell Physiol*. 2016 Jul; 231(7):1522-33.
- Manzi M, Bacigalupo ML, Carabias P, Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Espelt MV, Troncoso MF. Galectin-1 Controls the Proliferation and Migration of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Interaction With Hepatocarcinoma Cells. *J Cell Physiol*. 2016 Jul; 231(7):1522-33.
- Martens L., Van Damme P., Van Damme J., Staes A., Timmerman E., Ghesquiere B., Thomas G.R., Vandekerckhove J., and Gevaert K. The human platelet proteoma mapped by peptide-centric proteomics: a functional protein profile. *Proteomics* 2005; 5: 3193-3204.
- Mattheij NJ, Gilio K, van Kruchten R, Jobe SM, Wieschhaus AJ, Chishti AH, Collins P, Heemskerk JW, Cosemans JM. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem*. 2013 May 10; 288(19):13325-36.
- Mayo KH, Dings RP, Flader C, Nesmelova I, Hargittai B, van der Schaft DW, van Eijk LI, Walek D, Haseman J, Hoye TR, Griffioen AW. Design of a partial peptide mimetic of anginex with antiangiogenic and anticancer activity. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14; 278(46):45746-52.

Bibliografía

- Mege D, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Microparticles and cancer thrombosis in animal models. *Thromb Res.* 2016 Apr; 140 Suppl 1:S21-6. Review.
- Meikle CK, Kelly CA, Garg P, Wuescher LM, Ali RA, Worth RG. Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Jan 5; 4:147. Review.
- Merkle RK, Zhou Q, Schultz TK, Harper WB, Cummings RD. Characterization of an S-type lectin purified from porcine heart. *Arch Biochem Biophys.* 1989 Nov 1; 274(2):404-16.
- Ming Z, Hu Y, Xiang J, Polewski P, Newman PJ, Newman DK. Lyn and PECAM-1 function as interdependent inhibitors of platelet aggregation. *Blood.* 2011 Apr 7; 117(14):3903-6.
- Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26; 276(4):2494-502.
- Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003a Oct 24; 310(3):1010-6.
- Moiseeva EP, Williams B, Samani NJ. Galectin 1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003b Jan 20; 1619(2):125-32.
- Moiseeva EP, Javed Q, Spring EL, de Bono DP. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res.* 2000 Jan 14; 45(2):493-502.
- Monteiro M.C., O'Connor J.E., Martínez M. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas. Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Diagn Biol* vol.50 no.3 jul. /sep. 2001.
- Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood.* 2014 May 1; 123(18):2759-67. Review.

Bibliografía

- Morrison A, McMillan L, Radwanski K, Blatchford O, Min K, Petrik J. Storage of apheresis platelet concentrates after manual replacement of >95% of plasma with PAS 5. *Vox Sang.* 2014 Oct; 107(3):247-53.
- Muglia CI, Gobbi RP, Smaldini P, Delgado ML, Candia M, Zanuzzi C, Sambuelli A, Rocca A, Toscano MA, Rabinovich GA, Docena GH. Inflammation Controls Sensitivity of Human and Mouse Intestinal Epithelial Cells to Galectin-1. *J Cell Physiol.* 2016 Jul; 231(7):1575-85.
- Munday AD, Gaus K, López JA. The platelet glycoprotein Ib-IX-V complex anchors lipid rafts to the membrane skeleton: implications for activation-dependent cytoskeletal translocation of signaling molecules. *J Thromb Haemost.* 2010 Jan; 8(1):163-72.
- Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med.* 2008 Sep 18; 359(12):1261-70.
- Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 2016 Jun; 23(6):952-61. Review.
- Napoletano C, Zizzari IG, Rughetti A, Rahimi H, Irimura T, Clausen H, Wandall HH, Belleudi F, Bellati F, Pierelli L, Frati L, Nuti M. Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation. *Eur J Immunol.* 2012 Apr; 42(4):936-45.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* 1994 Apr; 28(3):239-42.
- Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, Hyland CD, Josefsson EC, Lebois M, Zhang JG, Baldwin TM, Di Rago L, Hilton DJ, Alexander WS. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 22; 111(16):5884-9.
- Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 2005 Aug; 6(8):607-14. Review.

Bibliografia

- Nishi N, Abe A, Iwaki J, Yoshida H, Itoh A, Shoji H, Kamitori S, Hirabayashi J, Nakamura T. Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. *Glycobiology*. 2008 Dec; 18(12):1065-73.
- Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, Italiano JE Jr, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K, Nagai R. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*. 2015 May 11; 209(3):453-66.
- Nissinen L, Koivunen J, Käpylä J, Salmela M, Nieminen J, Jokinen J, Sipilä K, Pihlavisto M, Pentikäinen OT, Marjamäki A, Heino J. Novel $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibitors reveal that integrin binding to collagen under shear stress conditions does not require receptor preactivation. *J Biol Chem*. 2012 Dec 28; 287(53):44694-702.
- Niswander LM, Fegan KH, Kingsley PD, McGrath KE, Palis J. SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. *Blood*. 2014 Jul 10; 124(2):277-86.
- Niu H, Chen X, Gruppo RA, Li D, Wang Y, et al. (2012) Integrin α IIb-Mediated PI3K/Akt Activation in Platelets. *PLoS ONE* 7(10): e47356. doi:10.1371/journal.pone.0047356
- Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer*. 2010 Apr 13; 102 Suppl 1:S2-9.
- Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009 Oct 22; 361(17):1676-87. Review.
- Norling LV, Perretti M, Cooper D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *J Endocrinol*. 2009 May; 201(2):169-84. Review.
- Nurden AT, Nurden P, Bermejo E, Combrié R, McVicar DW, Washington AV. Phenotypic heterogeneity in the Gray platelet syndrome extends to the expression of TREM family member, TLT-1. *Thromb Haemost*. 2008 Jul; 100(1):45-51.

Bibliografía

- O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, Du X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2011 Oct 13; 118(15):4215-23.
- Oehmcke S, Westman J, Malmström J, Mörgelin M, Olin AI, Kreikemeyer B, Herwald H. A novel role for pro-coagulant microvesicles in the early host defense against streptococcus pyogenes. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003529.
- Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006 Dec 8; 99(12):1293-304.
- Okreglak V, Drubin DG. Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J Cell Biol*. 2010 Mar 22;188(6):769-77.
- Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 9(1):60-71. Review.
- Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011 May 13; 108(10):1284-97.Review.
- Pace K.E., Lee C., Stewart P.L., and Baum L.G. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *The Journal of Immunology* 1999; 163: 3801-3811
- Pacienza N, Pozner RG, Bianco GA, D'Atri LP, Croci DO, Negrotto S, Malaver E, Gómez RM, Rabinovich GA, Schattner M. The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. *FASEB J*. 2008 Apr; 22(4):1113-23.
- Pallotta I, Lovett M, Rice W, Kaplan DL, Balduini A. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS One*. 2009 Dec 21; 4(12):e8359.
- Pande AH, Gupta RK, Sumati, Hajela K. Oxidation of goat hepatic galectin-1 induces change in secondary structure. *Protein Pept Lett*. 2003 Jun; 10(3): 265-75.

Bibliografía

- Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, Byzova TV, Podrez EA. Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circ Res.* 2013 Jan 4; 112(1):103-12.
- Papaspyridonos M, Smith A, Burnand KG, Taylor P, Padayachee S, Suckling KE, James CH, Greaves DR, Patel L. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug; 26(8):1837-44.
- Patterson RJ, Haudek KC, Voss PG, Wang JL. Examination of the role of galectins in pre-mRNA splicing. *Methods Mol Biol.* 2015; 1207:431-49.
- Patzelt J, Langer HF. Platelets in angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012 Sep; 10(5):570-7.
- Petrich B.G., Fogelstran P., Partridge A.W., Yousefi N., Ablooglu A.J., Shattil S.J., and Ginsberg M.H. The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa) activation. *J. Clin Invest.* 2007; 117: 2250-2259.
- Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, May F, Chakarova L, van Hengel J, Offermanns S, Krohne G, Kleinschnitz C, Brakebusch C, Nieswandt B. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood.* 2012 Jan 26; 119(4):1054-63.
- Poncini CV, Ilarregui JM, Batalla EI, Engels S, Cerliani JP, Cucher MA, van Kooyk Y, González-Cappa SM, Rabinovich GA. Trypanosoma cruzi Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms. *J Immunol.* 2015 Oct 1; 195(7):3311-24.
- Poon MC, Di Minno G, d'Oiron R, Zotz R. New Insights into the Treatment of Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus Med Rev.* 2016 Apr; 30(2):92-9. Review.
- Posada IMD, Lectez B, Sharma M, Oetken-Lindholm C, Yetukuri L, Zhou Y, Aittokallio T, Abankwa D. Rapalogs can promote cancer cell stemness in vitro in a Galectin-1 and H-ras-dependent manner. *Oncotarget.* 2017 Jul 4; 8(27):44550-44566.

Bibliografía

- Pozner RG, Negrotto S, D'Atri LP, Kotler ML, Lazzari MA, Gomez RM, Schattner M. Prostacyclin prevents nitric oxide-induced megakaryocyte apoptosis. *Br J Pharmacol.* 2005 Jun; 145(3):283-92.
- Qiao J, An N, Ouyang X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets.* 2017 Feb 21:1-5.
- Quintá HR, Pasquini JM, Rabinovich GA, Pasquini LA. [Axonal regeneration in spinal cord injury: key role of galectin-1]. *Medicina (B Aires).* 2014; 74(4):321-5. Review.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007a; 25:267-96. Review.
- Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol.* 2007b Oct; 17(5):513-20. Epub 2007 Oct 22. Review.
- Rabinovich GA, Ariel A, HersHKoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology.* 1999 May; 97(1):100-6.
- Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 2012 Mar 23; 36(3):322-35. Review.
- Raslan Z, Naseem KM. The control of blood platelets by cAMP signalling. *Biochem Soc Trans.* 2014 Apr; 42(2):289-94.
- Raslova H, Roy L, Vourc'h C, Le Couedic JP, Brison O, Metivier D, Feunteun J, Kroemer G, Debili N, Vainchenker W. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood.* 2003 Jan 15; 101(2):541-4.
- Reheman A, Gross P, Yang H, Chen P, Allen D, Leytin V, Freedman J, Ni H. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *J Thromb Haemost.* 2005 May; 3(5):875-83.

Bibliografía

- Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Feb; 1773(2):273-8.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005 Dec 15; 106(13):4066-75.
- Roda O, Ortiz-Zapater E, Martínez-Bosch N, Gutiérrez-Gallego R, Vila-Perelló M, Ampurdanés C, Gabius HJ, André S, Andreu D, Real FX, Navarro P. Galectin-1 is a novel functional receptor for tissue plasminogen activator in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1379-90, e1-5.
- Romaniuk MA, Negrotto S, Campetella O, Rabinovich GA, Schattner M. Identification of galectins as novel regulators of platelet signaling and function. *IUBMB Life*. 2011 Jul; 63(7):521-7.
- Romaniuk MA, Croci DO, Lapponi MJ, Tribulatti MV, Negrotto S, Poirier F, Campetella O, Rabinovich GA, Schattner M. Binding of galectin-1 to $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin triggers "outside-in" signals, stimulates platelet activation, and controls primary hemostasis. *FASEB J*. 2012 Jul; 26(7):2788-98.
- Romaniuk MA, Tribulatti MV, Cattaneo V, Lapponi MJ, Molinas FC, Campetella O, Schattner M. Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J*. 2010 Dec 15; 432(3):535-47.
- Romero JM, Trujillo M, Estrin DA, Rabinovich GA, Di Lella S. Impact of human galectin-1 binding to saccharide ligands on dimer dissociation kinetics and structure. *Glycobiology*. 2016 Dec; 26(12):1317-1327.
- Rossi B, Espeli M, Schiff C, Gauthier L. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. *J Immunol*. 2006 Jul 15; 177(2):796-803.

Bibliografia

- Ru YX, Dong SX, Liang HY, Zhao SX. Platelet production of megakaryocyte: A review with original observations on human in vivo cells and bone marrow. *Ultrastruct Pathol.* 2016 Jul-Aug; 40(4):163-70. Review.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA. 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 Mar; 5(3):241-51.
- Sandset PM. CXCL4-platelet factor 4, heparin-induced thrombocytopenia and cancer *Thromb Res.* 2012 Apr; 129 Suppl 1:S97-100. Review.
- Schmid W, Novacek G, Vogelsang H, Papay P, Primas C, Eser A, Panzer S. Platelets Toll-like receptor-4 in Crohns disease. *Eur J Clin Invest.* 2017 Feb; 47(2):109-116.
- Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell.* 2013 Jul 8; 24(1):130-7.
- Schwarz FP, Ahmed H, Bianchet MA, Amzel LM, Vasta GR. Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on oligomerization at the denaturation temperature. *Biochemistry.* 1998 Apr 28; 37(17):5867-77.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr; 11(4):288-300. Review.
- Song X, Qian X, Shen M, Jiang R, Wagner MB, Ding G, Chen G, Shen B. Protein kinase C promotes cardiac fibrosis and heart failure by modulating galectin-3 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Feb; 1853(2):513-21.
- Song X, Yang J, Hirbawi J, Ye S, Perera HD, Goksoy E, Dwivedi P, Plow EF, Zhang R, Qin J. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res.* 2012 Nov; 22(11):1533 -45.

Bibliografia

- Sot B, Kötting C, Deaconescu D, Suveyzdis Y, Gerwert K, Wittinghofer A. Unravelling the mechanism of dual-specificity GAPs. *EMBO J.* 2010 Apr 7; 29(7):1205-14.
- Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, Chan ER, Getz TM, Campbell RA, Kechele DO, Casari C, Piatt R, Caron KM, Mackman N, Weyrich AS, Parrott MC, Boulaftali Y, Adams MD, Peters LL, Bergmeier W. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. *J Clin Invest.* 2015 Apr; 125(4):1419-32.
- Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med (Berl).* 2016 Jan; 94(1):13-9.
- Stone KL, LoPresti MB, Crawford JM, DeAngelis R, Williams KR (1989) Enzymatic digestion of protein and HPLC peptide isolation Chap. 2. In: A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, San Francisco, pp 31–47.
- Stowell SR, Cho M, Feasley CL, Arthur CM, Song X, Colucci JK, Karmakar S, Mehta P, Dias-Baruffi M, McEver RP, Cummings RD. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *J Biol Chem.* 2009 Feb 20; 284(8):4989-99.
- Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol.* 2008 Mar 1; 180(5):3091-102.
- Strassel C, Brouard N, Mallo L, Receveur N, Mangin P, Eckly A, Bieche I, Tarte K, Gachet C, Lanza F. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood.* 2016 May 5; 127(18):2231-40.
- Stritt S, Wolf K, Lorenz V, Vögtle T, Gupta S, Bösl MR, Nieswandt B. Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) is dispensable for platelet integrin activation and function in mice. *Blood* 2015 Jan 8; 125(2):219-22.
- Suehiro Y, Veljkovic DK, Fuller N, Motomura Y, Massé JM, Cramer EM, Hayward CP. Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes. *Thromb Haemost.* 2005 Sep; 94(3):585-92.

Bibliografía

- Suzuki Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. [Identification of the novel platelet activation receptor CLEC-2 and Its pathological and physiological roles]. *Rinsho Byori*. 2010 Dec; 58(12):1193-202.
- Tapia Cadena, Mercedes. Tesis de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. Estudios ultraestructurales y de captación de mepacrina en plaquetas humanas adicionadas con galectina-1. - 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2012. E-Book.
- Thiemann S, Man JH, Chang MH, Lee B, Baum LG. Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations. *J Biol Chem*. 2015 Sep 11; 290(37):22662-77.
- Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr; 1855(2):235-47. Review.
- Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol*. 2008 Feb; 172(2):545-53.
- Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F, Griffioen AW. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*. 2010 Aug 1; 70(15):6216-24.
- Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol*. 2010 Nov 15; 191(4):861-74.
- Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 2007 Aug; 8(8):825-34.
- Toscano MA, Campagna L, Molinero LL, Cerliani JP, Croci DO, Ilarregui JM, Fuertes MB, Nojek IM, Fededa JP, Zwirner NW, Costas MA, Rabinovich GA. Nuclear factor (NF)- κ B

Bibliografia

- controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol Immunol*. 2011 Sep; 48(15-16):1940-9.
- Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec; 30(12):2357-61. Review.
 - Valet C, Chicanne G, Severac C, Chaussade C, Whitehead MA, Cabou C, Gratacap MP, Gaits-Iacovoni F, Vanhaesebroeck B, Payrastre B, Severin S. Essential role of class II PI3K-C2 α in platelet membrane morphology. *Blood*. 2015 Aug 27; 126(9):1128-37.
 - van den Brûle F, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, Berchuck A, Castronovo V. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest*. 2003 Mar; 83(3):377-86.
 - van Hattum H, Branderhorst HM, Moret EE, Nilsson UJ, Leffler H, Pieters RJ. Tuning the preference of thiodigalactoside- and lactosamine-based ligands to galectin-3 over galectin-1. *J Med Chem*. 2013 Feb 14; 56(3):1350-4.
 - van Nispen tot Pannerden H, de Haas F, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S, Heijnen HF. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood*. 2010 Aug 19; 116(7):1147-56.
 - Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul; 7(7):1057-66.
 - Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood*. 2007 Sep 15; 110(6):1723-9. Review.
 - Vasina E, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Platelets and platelet-derived microparticles in vascular inflammatory disease. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010 Dec; 9(5):346-54. Review.
 - Vasta GR. Roles of galectins in infection *Nat Rev Microbiol*. 2009 June ; 7(6): 424–438.

Bibliografia

- Vasta GR. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 946:21-36. Review.
- Vogel S, Bodenstern R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J, Schäffer TE, Bohn E, Frick JS, Borst O, Münzer P, Walker B, Markel J, Csanyi G, Pagano PJ, Loughran P, Jessup ME, Watkins SC, Bullock GC, Sperry JL, Zuckerbraun BS, Billiar TR, Lotze MT, Gawaz M, Neal MD. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest.* 2015 Dec; 125(12):4638-54.
- Wachowicz B, Morel A, Miller E, Saluk J. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2016; 76(4):269-281. Review.
- Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul; 25(7):1321-4. Review.
- Walzel H., Schulz U., Neels P., and Brock J., "Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45" *Immunology Letters* 67: 193-202, 1999.
- Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets.* 2017 Mar 29:1-8.
- Weng Z, Li D, Zhang L, Chen J, Ruan C, Chen G, Gartner TK, Liu J. PTEN regulates collagen-induced platelet activation. *Blood.* 2010 Oct 7; 116(14):2579-81.
- White JG. Localization of a lysosomal enzyme in platelets from patients with the Whiteplatelet syndrome. *Platelets.* 2006 Jun; 17(4):231-49.
- Winkler W, Zellner M, Diestinger M, Babeluk R, Marchetti M, Goll A, Zehetmayer S, Bauer P, Rappold E, Miller I, Roth E, Allmaier G, Oehler R. Biological variation of the platelet proteome in the elderly population and its implication for biomarker research. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Jan; 7(1):193-203.

Bibliografia

- Worth RG, Chien CD, Chien P, Reilly MP, McKenzie SE, Schreiber AD. Platelet FcγRIIA binds and internalizes IgG-containing complexes. *Exp Hematol.* 2006 Nov; 34(11):1490-5.
- Wrzyszczyk A, Urbaniak J, Sapa A, Woźniak M. An efficient method for isolation of representative and contamination-free population of blood platelets for proteomic studies. *Platelets.* 2017 Jan; 28(1):43-3.
- Xiang B, Zhang G, Stefanini L, Bergmeier W, Gartner TK, Whiteheart SW, Li Z. The Src family kinases and protein kinase C synergize to mediate Gq-dependent platelet activation. *J Biol Chem.* 2012 Nov 30; 287(49):41277-87.
- Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol.* 1995 Sep; 147(3):815-22.
- Yakushina VD, Vasil'eva OA, Novitskii VV, Andreeva NV, Starikova EG, Tashireva LA, Prokhorenko TS, Zima AP, Ryazantseva NV. Effect of galectin-1 on apoptosis of CD4 (+) lymphocytes differentiated in vitro towards regulatory T cells. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Mar; 156(5):669-72.
- Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res.* 2000 Mar 15; 59(6):722-30.
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008 Jun 13; 10:e17.
- Yang RY, Hsu DK, Yu L, Chen HY, Liu FT. Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9; 279(28):29761-6.
- Ye F, Snider AK, Ginsberg MH. Talin and kindlin: the one-two punch in integrin activation. *Front Med.* 2014 Mar; 8(1):6-16. Review.

Bibliografia

- Yeung J, Holinstat M. 12-lipoxygenase: a potential target for novel anti-platelet therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011 Jul 1; 9(3):154-64. Review.
- Yeung J, Tourdot BE, Fernandez-Perez P, Vesci J, Ren J, Smyrniotis CJ, Luci DK, Jadhav A, Simeonov A, Maloney DJ, Holman TR, McKenzie SE, Holinstat M. Platelet 12-LOX is essential for FcγRIIa-mediated platelet activation. *Blood*. 2014 Oct 2; 124(14):2271-9.
- Yin H, Liu J, Li Z, Berndt MC, Lowell CA, Du X. Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. *Blood*. 2008a Aug 15; 112(4):1139-46.
- Yin H, Stojanovic A, Hay N, Du X. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation. *Blood*. 2008b Jan 15; 111(2):658-65.
- Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilkens J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem*. 2007 Jan 5; 282(1):773-81.
- Zahedi R, Sickmann A. Analysis of post-translational modifications. *Proteomics*. 2013 Mar;13(6):901-3.
- Zarpellon A, Celikel R, Roberts JR, McClintock RA, Mendolicchio GL, Moore KL, Jing H, Varughese KI, Ruggeri ZM. Binding of alpha-thrombin to surface-anchored platelet glycoprotein Ib(alpha) sulfotyrosines through a two-site mechanism involving exosite I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 24;108(21):8628-33.
- Zhang G, Xiang B, Dong A, Skoda RC, Daugherty A, Smyth SS, Du X, Li Z. Biphasic roles for soluble guanylyl cyclase (sGC) in platelet activation. *Blood*. 2011 Sep 29; 118(13):3670-9.
- Zhang S, Zhang S, Hu L, Zhai L, Xue R, Ye J, Chen L, Cheng G, Mruk J, Kunapuli SP, Ding Z. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis. *Circulation*. 2015 Mar 31; 131(13):1160-70.

Bibliografia

- Zhang W, Deng W, Zhou L, Xu Y, Yang W, Liang X, Wang Y, Kulman JD, Zhang XF, Li R. Identification of a juxtamembrane mechanosensitive domain in the platelet mechanosensor glycoprotein Ib-IX complex. *Blood*. 2015 Jan 15; 125(3):562-9.
- Zhao XY, Chen TT, Xia L, Guo M, Xu Y, Yue F, Jiang Y, Chen GQ, Zhao KW. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010 Aug; 31(8):1367-75.
- Zhao XY, Zhao KW, Jiang Y, Zhao M, Chen GQ. Synergistic induction of galectin-1 by CCAAT/enhancer binding protein alpha and hypoxia-inducible factor 1alpha and its role in differentiation of acute myeloid leukemic cells. *J Biol Chem*. 2011 Oct 21; 286(42):36808-19.
- Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, McKenzie SE, Cooley BC, Poncz M, Newman PJ. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*. 2013 Mar 7; 121(10):1858-67.