

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**



**REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN  
PLAQUETARIA POR LA ACETILACIÓN  
DE PROTEÍNAS NO HISTONAS**

**TESIS DOCTORAL  
PRESENTADA POR:**

**ANA MARIA LATORRE CAMPOS**

**VALÈNCIA, 2019**

**Hospital Universitari i Politècnic La Fe  
Institut d'Investigació Sanitària La Fe  
València**



**D. ANTONIO MOSCARDÓ MARTÍNEZ**, Doctor Facultativo del Grupo de Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascul ar del Hospital Universitari i Politècnic La Fe

CERTIFICA:

Que **Dña. ANA MARIA LATORRE CAMPOS**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Graduada en Enfermería por la Universitat de València, ha realizado bajo mi dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, en el grupo acreditado de Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascul ar, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de:

**“REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA POR LA ACETILACIÓN DE PROTEÍNAS NO HISTONAS”.**

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 16 de Septiembre de 2019.

Fdo. Dr. Antonio Moscardó Martínez



**D. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL**, Catedrático de Bioquímica, Biología Molecular y Bioquímica Clínica en la Facultad de Medicina de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que **Dña. ANA MARIA LATORRE CAMPOS**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Graduada en Enfermería por la Universitat de València, ha realizado bajo mi tutela en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, en el grupo acreditado de Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascular, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de:

**“REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA POR LA ACETILACIÓN DE PROTEÍNAS NO HISTONAS”.**

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 16 de Septiembre de 2019.

Fdo. Dr. Jose Vicente Castell Ripoll



Este trabajo ha sido financiado por las siguientes becas y proyectos:

Beca de la Fundación Española de Trombosis y Hemostasia para miembros de la SETH para formación en trombosis y hemostasia (becario de la FETH) 2014. “Determinación de biomarcadores en el síndrome coronario agudo con influencia sobre la función plaquetaria. Su relación con la estratificación del riesgo y la evolución clínica de los pacientes”. IP: Antonio Moscardó Martínez

Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral de la Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte 2016. “Regulación de la función plaquetaria por la acetilación de proteínas no histonas”. ACIF/2016/465. IP: Antonio Moscardó Martínez

Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). “Caracterización de un perfil de biomarcadores asociados a función plaquetaria con valor predictivo en la estratificación del riesgo y la evaluación clínica en el síndrome coronario agudo”. PI-13/00016. IP: Antonio Moscardó Martínez

Premio López Borrasca 2014 de la Sociedad Española de Hemostasia y Trombosis. “Efecto de la adenosina en las interacciones celulares en el proceso trombótico. Su posible implicación en pacientes con Síndrome Coronario Agudo”. IP: Antonio Moscardó Martínez

Proyecto Hexacath. “Caracterización de un perfil de biomarcadores asociados a función plaquetaria con valor predictivo en la estratificación del riesgo y la evolución clínica en el síndrome coronario agudo. Influencia de la implantación de un stent tipo Optimux de Hexacath”. IP: Antonio Moscardó Martínez





*A un Carrasquet i una Norieta*



## AGRAÏMENTS

*Vaig conèixer un vell pastor  
que ses ovelles menava·  
Cada jorn, de sol a sol,  
amb sa flauta acompanyat,  
eixa tonada cantava,  
eixa tonada cantava:*

*Com serà el mar,  
serà blau i gran com diuen;  
serà veritat  
que de nits és com la plata?  
Tothom que el veu  
es queda ple d'enyorança·  
Digue'm tu, sol,  
que véns d'una altra contrada,  
has vist el mar?*

*Tota ma vida he viscut  
ací, del pla a la muntanya,  
i fer diners no he pogut  
per veure la costa llunyana·  
Sé que hi ha un Mediterrà  
que té l'encís de donzella;  
sé que hi ha barques de vela,  
sé que hi ha mar a Calella,  
on les ones van i vénen  
al compàs de l'havanera...*

*Però jo mai no he vist el mar!*



## ABREVIATURAS

**2MeSamp:** 2 - methylthioadenosine 5' - monophosphate triethylammonium (bloqueante del receptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>)

**5HT:** 5-hidroxitriptamina o serotonina (marcaje de gránulos densos)

**AA:** ácido araquidónico

**AAS:** aspirina (ácido acetil salicílico)

**AC:** adenilato ciclasa

**ADP:** adenosina difosfato

**AGK2:** 2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furanyl]-N-5-quinolinyl-2-propenamide (inhibidor SIRT2)

**AMPc:** adenosina monofosfato cíclico

**AKT/PKB:** proteína cinasa B

**ARNm:** ARN mensajero

**miARN:** micro ARN

**ATP:** adenosina trifosfato

**Ca<sup>2+</sup>:** calcio iónico

**CAM:** 5-(2-Hydroxynaphthalen-1-ylmethyl) – 6 - phenyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-pyrimidin-4-one, 5-[(2-hydroxy- 1-naphthyl) methyl] -2-mercapto -6-phenyl-4(3H)-Pyrimidinone; cambinol (inhibidor general de las sirtuinas)

**CCD:** dominio “colied-coil”

**COX-1:** ciclooxigenasa-1

**cPLA<sub>2</sub>:** fosfolipasa A<sub>2</sub> citoplasmática

**CRP:** péptido relacionado con el colágeno “collagen related peptide”

**DAG:** diacil glicerol

**DBD:** dominio de unión al ADN

**EX527:** 6 – Chloro – 2 ,3 ,4 ,9 – tetrahydro - 1H – Carbazole – 1 - carboxamide (inhibidor de la SIRT1)

**ERK1/2 (p44/p42 MAPK):** cinasa de la familia ERK “extracelular signal regulated kinases” o MAPK “mitogen activated protein kinase”

**FURA 2/AM:** fura-2pentakis(acetoxymethyl) ester (indicador de calcio intracelular)

**FvW:** factor von Willebrand

**Fyn/Lyn:** tirosina cinasa Fyn/Lyn

**GP:** glicoproteína

**GNAT:** acetil transferasa "GCN5-related N-acetyltransferases"

**GSK-3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa cinasa-3b

**HAT:** histona acetil transferasa

**HDAC:** histona deacetilasa

**IBOP:** [1S-(1 alpha,2 beta(5Z),3 alpha(1E,3R),4 alpha)] -7- [3- (3-hydroxy- 4- (4'-iodophenoxy) -1-butenyl)-7-oxabicyclo-[2.2.1]heptan-2-yl]-5-h eptenoic acid (análogo estable del TXA<sub>2</sub>)

**IL-1 $\beta$ :** interleucina 1 $\beta$

**IP<sub>3</sub>:** inositol trifosfato

**ITAM:** dominio de activación inmune basado en tirosina "immunoreceptor tyrosine-based activation motif"

**JAK:** cinasa Janus

**LINKER:** dominio de unión

**Lys/K:** aminoácido lisina

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NAM:** Pyridine – 3 - carboxylic acid amide; nicotinamida (inhibidor general de las sirtuinas)

**MYST:** acetil transferasa "MOZ, Ybfz/Sas3, Sas2, Tip 66"

**NO:** óxido nítrico

**NTD:** dominio N-terminal

**p38/MAPK:** cinasa de la familia MAPK MAP "mitogen activated protein kinase"

**P<sub>2</sub>:** receptores de nucleótidos de adenina

**p300/CBP:** acetil transferasa proteína de unión CREB/p300 "CREB binding protein"

**PAR:** receptor activado por proteasas "protease activated receptor"

**PGI<sub>2</sub>**: prostaciclina

**PI3K**: fosfatidil inositol 3 cinasa

**PKC**: proteína cinasa C

**PLC**: fosfolipasa C

**PPP**: plasma pobre en plaquetas

**PRP**: plasma rico en plaquetas

**RGDS**: Arg – Gly – Asp - Ser (arginina-glicina-asparagina-serina)  
(bloqueante de la Glicoproteína  $\alpha_{IIb}\beta_3$ )

**SCA**: sistema canalicular abierto

**SH2**: dominio SH2 de unión a puntos de fosforilación

**Sir**: sirtinol (inhibidor SIRT1)

**SIRT**: sirtuinas

**Ser/S**: aminoácido serina

**SQ29,548 (SQ)**: [ 1S - [ 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  (Z), 3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ ] ] – 7 - [3- [ 2-[ (phenylamino) carbonyl ] hydrazino] methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1] hept-2-yl]-5-heptenoic acid; SQ29,548(bloqueante del receptor del TXA<sub>2</sub>)

**STAT3**: factor de transcripción “signal transducer and activator of transcription”

**STD**: sistema tubular denso

**Syk**: tirosina cinasa Syk “Spleen tyrosine kinase”

**TAD**: en el dominio de activación transcripcional

**TBA**: N-Hydroxy-4-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrindo[4,3-b] indol - 5-ylmethyl) benzamide hydrochloried; tubastatin A (inhibidor HDAC6)

**Thr/T**: aminoácido treonina

**Tyr/Y**: aminoácido tirosina

**TPO**: trombopoyetina

**TSA**: [R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino) phenyl] – N – hydroxy -4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamamide; trichostatin A (inhibidor de las HDCA)

**TXA<sub>2</sub>**: tromboxano A<sub>2</sub>

**TXA<sub>2</sub>-R**: receptor del tromboxano A<sub>2</sub>

**TXB<sub>2</sub>**: tromboxano B<sub>2</sub>

**U46619**: 9,11 - Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethano-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ ,  
(análogo estable del TXA<sub>2</sub>)

**Zn<sup>2+</sup>**: zinc



- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**
- 3. MATERIAL Y MÉTODOS**
- 4. RESULTADOS**
- 5. DISCUSIÓN**
- 6. CONCLUSIONES**
- 7. BIBLIOGRAFÍA**
- 8. ANEXO**



## ÍNDICE



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Papel de las plaquetas en la fisiopatología .....	4
1.2. Las plaquetas: estructura celular y componentes moleculares ...	7
1.3. Secuencia de activación de las plaquetas .....	13
1.4. Receptores plaquetarios.....	16
1.4.1. Receptores PAR .....	18
1.4.2. Receptores del ADP .....	20
1.4.3. Receptores tipo integrinas.....	21
1.4.4. Receptores del colágeno.....	23
1.5. Modificaciones postraduccionales de las proteínas: acetilación	24
1.5.1. Acetilación de histonas.....	26
1.5.2. Acetilación de proteínas no histonas .....	27
1.5.3. Regulación de la acetilación de proteínas y clasificación de las acetilasas y deacetilasas .....	30
1.5.4. Procesos celulares regulados por la acetilación .....	33
1.6. Factores transcripcionales en las plaquetas .....	33
1.6.1. STAT3.....	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	47
3.1. Equipos .....	49
3.2. Material .....	50

3.3. Reactivos .....	51
3.3.1. Inductores de la activación plaquetaria .....	51
3.3.2. Moduladores de la respuesta plaquetaria .....	52
3.3.3. Anticuerpos monoclonales o policlonales .....	55
3.3.4. Otros reactivos .....	56
3.4. Extracción de la sangre y separación de las células sanguíneas.....	57
3.4.1. Lavado de las células sanguíneas .....	58
3.5. Estudios de agregación o lumi-agregación en plaquetas lavadas.....	58
3.6. Determinaciones bioquímicas.....	60
3.6.1. Determinación del TXB <sub>2</sub> por ELISA.....	60
3.6.2. Determinación de la liberación de gránulos densos por serotonina .....	61
3.7. Estudios de movimientos de Ca <sup>2+</sup> .....	62
3.8. Purificación de ARN, retrotranscripción y PCR .....	64
3.9. Técnicas inmunológicas .....	65
3.9.1. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i> .....	66
3.9.2. Inmunoprecipitación de proteínas .....	68
3.10. Aislamiento del citoesqueleto .....	69
3.11. Citometría de flujo .....	69
3.12. Microscopía confocal.....	70

3.13. Análisis estadístico .....	70
4. RESULTADOS .....	73
4.1. Patrón de proteínas acetiladas en Lys en plaquetas humanas .	75
4.2. Las HDAC regulan el nivel de acetilación de algunas proteínas en las plaquetas humanas.....	78
4.3. Especificidad de la regulación de la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina por las distintas HDAC .....	81
4.4. La HDAC6 está presente en las plaquetas humanas y se incorpora en el citoesqueleto de las plaquetas activadas .....	82
4.5. La agregación de las plaquetas induce la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina.....	85
4.6. La regulación de la función de las plaquetas por las HDAC.....	87
4.6.1. Agregación plaquetaria y liberación de gránulos densos ...	87
4.6.2. Regulación de los movimientos de $Ca^{2+}$ por las HDAC.....	92
4.7. Efectos de la inhibición específica de la HDAC6 con Tubastatin A.....	94
4.8. El patrón de proteínas acetiladas en Lys en las plaquetas humanas se altera por la acción del AAS .....	96
4.9. Regulación de la función de las plaquetas por las sirtuinas ....	101
4.9.1. Regulación de la agregación plaquetaria por las sirtuinas	102
4.9.2. Regulación de la liberación de gránulos densos por las sirtuinas.....	104
4.9.3. Regulación de los movimientos de $Ca^{2+}$ por las sirtuinas.	105

4.9.4.	Regulación de la síntesis de TXA <sub>2</sub> por las sirtuinas.....	106
4.9.5.	Regulación de la acetilación de proteínas en las plaquetas humanas por las sirtuinas.....	108
4.10.	Presencia de las sirtuinas en las plaquetas humanas.....	109
4.10.1.	Influencia de SIRT2 en la función plaquetaria.....	111
4.10.2.	Influencia de las sirtuinas en nivel de acetilación de las Lys de proteínas plaquetarias humanas .....	115
4.11.	Regulación de la acetilación de AKT/PKB mediada por Sirtuinas. ....	116
4.12.	La fosforilación de STAT3 en las plaquetas está mediada por la síntesis de TXA <sub>2</sub> .....	121
4.13.	Implicaciones funcionales de la inhibición de STAT3.....	129
4.13.1.	La regulación de la agregación plaquetaria por STA21 ..	130
4.13.2.	La regulación de la liberación de gránulos densos por el STA21.....	131
5.	DISCUSIÓN .....	137
6.	CONCLUSIONES.....	171
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	177
8.	ANEXO .....	<b>Error! No s'ha definit el marcador.</b>



## ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Los componentes de la hemostasia .....	5
Figura 1.2. La morfología de la plaqueta .....	9
Figura 1.3. La síntesis del TXA <sub>2</sub> en las plaquetas.....	13
Figura 1.4. Modelo de adhesión de las plaquetas.....	14
Figura 1.5. Secuencia de formación del trombo plaquetario .....	16
Figura 1.6. Receptores plaquetarios.....	17
Figura 1.7. Activación de la plaqueta mediante la transmisión de señal a través de sus receptores.....	18
Figura 1.8. Mecanismo de activación del receptor PAR-1 por la trombina.....	20
Figura 1.9. Receptores para el ADP y su implicación en la reactividad plaquetaria. ....	21
Figura 1.10. Estructura de la Gp $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....	23
Figura 1.11. Activación de la GPVI.....	24
Figura 1.12. Inhibición de la COX-1 por el AAS.....	28
Figura 1.13. Clasificación de la histonas deacetilasas.....	31
Figura 1.14. Estructura del STAT y sus dominios más importantes.	36
Figura 1.15. La fosforilación de STAT3 está mediada por el colágeno en las plaquetas.....	38

**TABLAS INTRODUCCIÓN**

Tabla 1.1. Contenido de los gránulos plaquetarios .....	10
Tabla 1.2. Clasificación de las HAT .....	30
Tabla 1.3. Clasificación de las HDAC .....	32
Tabla 1.4. Factores de transcripción en las plaquetas .....	35

**FIGURAS RESULTADOS**

Figura 4.1. Las plaquetas humanas en reposo poseen un patrón de proteínas acetiladas en Lys.....	76
Figura 4.2. El patrón de proteínas plaquetarias acetiladas en Lys se altera con la agregación plaquetaria.....	77
Figura 4.3. El efecto del TSA en la acetilación de las Lys de proteínas de plaquetas humanas.....	79
Figura 4.4. La acetilación de la $\alpha$ -tubulina en plaquetas humanas en reposo e incubadas con TSA.....	80
Figura 4.5. Microscopía confocal de la $\alpha$ -tubulina acetilada en plaquetas en reposo.....	81
Figura 4.6. Variación en la acetilación de la $\alpha$ -tubulina por la inhibición de las HDAC y las sirtuinas.....	82
Figura 4.7. La HDAC6 está presente en plaquetas humanas.....	83
Figura 4.8. La $\alpha$ -tubulina acetilada se incorpora al citoesqueleto.....	84
Figura 4.9. La HDAC6 se incorpora al citoesqueleto .....	85

Figura 4.10. La agregación de las plaquetas induce la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina.....	86
Figura 4.11. El bloqueo de la agregación de las plaquetas impide la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina. ....	87
Figura 4.12. El efecto del TSA sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno y U46619 .....	88
Figura 4.13. La incubación con TSA reduce la agregación plaquetaria al estimular con diferentes agonistas.....	89
Figura 4.15. El efecto del TSA sobre la liberación de gránulos densos. ....	90
Figura 4.16. El efecto del TSA en la acetilación de la $\alpha$ -tubulina en plaquetas estimuladas con agonistas plaquetarios.....	91
Figura 4.17. El efecto del TSA sobre la agregación plaquetaria y la liberación de gránulos densos inducida por colágeno y U46619. ....	92
Figura 4.18. El TSA provoca una disminución del $Ca^{2+}$ en plaquetas estimuladas con colágeno o U46619.....	94
Figura 4.19. El TBA produce una disminución de la agregación plaquetaria al colágeno. ....	95
Figura 4.20. El TBA induce la acetilación de la $\alpha$ -tubulina. ....	96
Figura 4.21. El efecto del AAS en la acetilación de proteínas en plaquetas humanas. ....	98
Figura 4.22. El AAS produce acetilación de la $\alpha$ -tubulina de manera dosis dependiente. ....	99

Figura 4.23. El AAS produce acetilación de la $\alpha$ -tubulina con una cinética de tiempo .....	100
Figura 4.24. El AAS y TSA producen acetilación de la $\alpha$ -tubulina..	100
Figura 4.25. El efecto del CAM sobre la agregación plaquetaria. ..	103
Figura 4.26. El CAM reduce la agregación plaquetaria al estimular con diferentes agonistas.....	104
Figura 4.27. El CAM provoca la disminución de la liberación de los gránulos densos.....	105
Figura 4.28. La concentración de $Ca^{2+}$ disminuye en plaquetas preincubadas con CAM. ....	106
Figura 4.29. El efecto del CAM sobre la síntesis de $TXA_2$ en plaquetas estimuladas con colágeno.....	107
Figura 4.30. La inhibición de las sirtuinas provoca pocos cambios en la acetilación de las Lys de proteínas plaquetarias humanas en reposo .....	109
Figura 4.31. La SIRT1 y la SIRT2 están presente en plaquetas humanas. ....	110
Figura 4.32. El ARNm de SIRT1 y SIRT2 está presente en plaquetas humanas. ....	111
Figura 4.33. La SIRT2 regula la agregación plaquetaria.....	112
Figura 4.34. El AGK2 provoca la disminución de la liberación de gránulos densos.....	113
Figura 4.35. La SIRT2 regula la concentración de $Ca^{2+}$ citoplasmático. ....	114

Figura 4.36. La inhibición de las sirtuinas no provoca grandes alteraciones en el patrón de proteínas acetiladas Lys de las plaquetas humanas en reposo. .... 116

Figura 4.37. La incubación con AGK2 o CAM aumenta el nivel de acetilación de la AKT en plaquetas en reposo..... 118

Figura 4.38. La incubación con AGK2 disminuye la fosforilación de la AKT en plaquetas estimuladas..... 119

Figura 4.39. La incubación con AGK2 disminuye el nivel de fosforilación GSK-3 $\beta$ . .... 120

Figura 4.40. La estimulación con colágeno provoca acetilación de AKT..... 120

Figura 4.41. El colágeno produce una cinética de fosforilación de STAT3..... 122

Figura 4.42. El bloqueo del receptor del TXA<sub>2</sub> disminuye la fosforilación de STAT3 al estimular con colágeno. .... 123

Figura 4.43. El AAS impide la fosforilación de STAT3 al estimular con colágeno ..... 124

Figura 4.44. El U46619 y el IBOP producen una cinética de fosforilación de STAT3. .... 125

Figura 4.45. El bloqueo del receptor del TXA<sub>2</sub> impide la fosforilación de STAT3 al estimular con U46619..... 125

Figura 4.46. El ADP no produce una cinética de fosforilación de STAT3..... 126

Figura 4.47. La trombina produce una cinética de fosforilación de STAT3 que se revierte con el SQ. .... 127

Figura 4.48. El 2MeSamp impide la fosforilación de STAT3 inducida por el U46619, en cambio el RGDS no bloquea la fosforilación..... 128

Figura 4.49. El TPO fosforila de STAT3 de forma dosis dependiente y SQ bloquea parcialmente su fosforilación..... 129

Figura 4.50 El efecto del STA21 sobre la agregación plaquetaria. 130

Figura 4.51. El efecto del STA21 sobre la liberación de gránulos densos. .... 131

Figura 4.52. Efecto del STA21 en la fosforilación de la STAT3 en plaquetas estimuladas con distintos agonistas. .... 132

Figura 4.53. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la agregación plaquetaria. .... 133

Figura 4.54. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la liberación plaquetaria. .... 134

Figura 4.55. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la fosforilación de STAT3. .... 135

**FIGURAS DISCUSIÓN**

Figura 5.1. La Acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas.....152

Figura 5.2. La acetilación/deacetilación de la AKT regula la actividad plaquetaria. .... 159

Figura 5.3. La fosforilación de STAT3 está mediada por el receptor del TXA<sub>2</sub>.....166

# 1. INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

En las primeras descripciones que se realizaron de los componentes de la sangre se dijo que ésta estaba formada por dos tipos celulares, los leucocitos y los hematíes<sup>1</sup>. No se consideraron a las plaquetas como un elemento más, sino que se les confundió con bacterias que habían contaminado la sangre o simplemente partículas de polvo. Poco a poco y conforme fueron avanzando los estudios en el campo de la óptica, se descubrió que había un elemento más en la sangre, las plaquetas<sup>2</sup>. Varias fueron las causas que retrasaron su hallazgo, como es su pequeño tamaño, mucho más que el de los hematíes y los leucocitos, y su capacidad de agregación, es decir de unirse las unas con las otras, impidiendo observarlas como elementos independientes<sup>1</sup>.

No fue hasta finales del siglo XIX, cuando Giulio Bizzozero observó en la circulación sanguínea de animales vivos la presencia de unos elementos que se agrupaban en los vasos dañados y daban lugar a la formación del tapón hemostático. Les llamó “petit plaques” (pequeñas placas)<sup>3</sup>. Pero su origen continuaba siendo un misterio. Algunos científicos creían que las plaquetas procedían de los núcleos que habían sido expulsados por los eritoblastos en su proceso de maduración. En cambio, otros pensaban que procedían de la desintegración de los leucocitos cuando éstos se activaban. A principios del siglo XX, James Homer Wright demostró a través de la tinción de preparaciones histológicas de médula ósea, que eran los megacariocitos los que daban lugar a las plaquetas mediante la fragmentación de su citoplasma<sup>4</sup>.

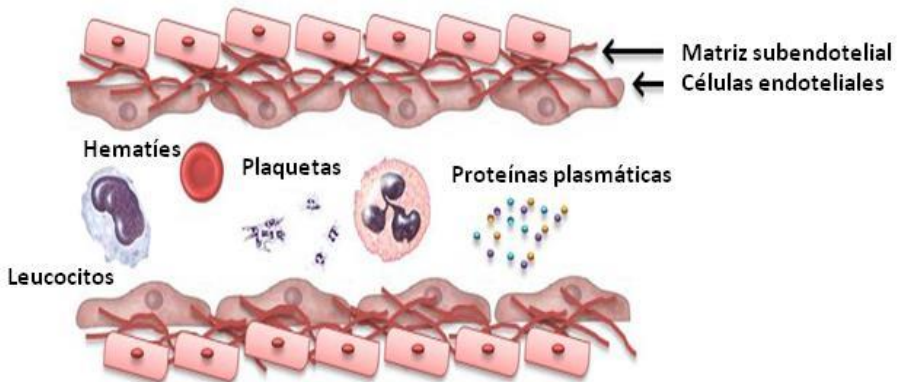
## 1. Introducción

Pese a ser el elemento forme más pequeño de la sangre, como veremos, a lo largo de los últimos 50 años se ha avanzado enormemente en el conocimiento del papel jugado por las plaquetas en la hemostasia y la trombosis. Y no sólo esto, sino que recientemente se está poniendo de manifiesto que las plaquetas participan de forma central en muchos otros procesos de la fisiología y la fisiopatología humana, tanto del sistema cardiovascular como de otras respuestas del organismo (respuesta inmune, inflamación, reparación de tejidos, etc.)<sup>5</sup>.

### 1.1. Papel de las plaquetas en la fisiopatología

Tradicionalmente, se ha considerado que la plaqueta tenía una única función, participar en la hemostasia y la trombosis. La hemostasia se define como un mecanismo formado por una serie de reacciones fisiológicas y bioquímicas que tienen como finalidad detener la hemorragia cuando se produce un daño o un traumatismo en un vaso sanguíneo<sup>6</sup>.

La hemostasia requiere de la interacción de tres sistemas como son: los componentes del vaso (células endoteliales y matriz subendotelial), los elementos celulares de la sangre (leucocitos, hematíes y plaquetas) y las proteínas plasmáticas de los sistemas intrínseco y extrínseco de la coagulación (Figura 1.1)<sup>6,7</sup>.



**Figura 1.1. Los componentes de la hemostasia.** La hemostasia se consigue por la interacción de tres sistemas: componentes del vaso (células endoteliales y matriz subendotelial (señaladas con unas flechas), componentes celulares de la sangre (leucocitos, hematíes y plaquetas) y las proteínas plasmáticas del sistema tanto intrínseco como extrínseco de la coagulación.

El equilibrio hemostático se consigue por el balance que se produce entre los distintos sistemas que lo forman. Pero alteraciones cualitativas y/o cuantitativas en uno o varios de estos sistemas pueden dar lugar a una hemostasia y/o coagulación alteradas que pueden acabar en diferentes problemas hemorrágicos o trombóticos<sup>8,9</sup>. Un ejemplo de trombosis es aquel que ocurre en los sitios de daño vascular causados por la presencia de una placa aterosclerótica. Estas estructuras provocan una alteración de la hemostasia que puede acabar en una trombosis arterial o venosa en puntos críticos de la circulación coronaria o cerebral. Por lo tanto, se define la trombosis como una forma descontrolada de la hemostasia.

La plaqueta es un elemento de la sangre altamente especializado, como demuestra su participación crucial en los procesos de hemostasia y trombosis. Su papel está claramente establecido en la aparición de diátesis hemorrágicas cuando existe

una disfunción plaquetaria cuantitativa y/o cualitativa<sup>10</sup>, y por el beneficio clínico antitrombótico de los fármacos antiplaquetarios<sup>11,12</sup>.

La trombosis es una patología compleja, dinámica y multifactorial a la que contribuyen activamente el endotelio, los factores plasmáticos de la coagulación, las células sanguíneas, los factores hemorreológicos dependientes de la geometría de los vasos y la viscosidad de la sangre.

En la actualidad, está ampliamente aceptado que una activación-agregación plaquetaria elevada podría conducir a complicaciones isquémicas en el área vascular cerebral o coronaria. Los fármacos antiplaquetarios más utilizados en las alteraciones trombóticas son el ácido acetilsalicílico (AAS) o aspirina y los bloqueantes del receptor  $P_2Y_{12}$ . Su asociación para la prevención y el tratamiento de estas complicaciones trombóticas han demostrado un alto beneficio clínico para el tratamiento de estas complicaciones y su prevención secundaria<sup>13</sup>.

Pero la plaqueta no solo juega un papel determinante en la hemostasia primaria y en los procesos trombóticos, sino que también participa en otros procesos fisiopatológicos como la inmunidad, el cáncer, la inflamación, la angiogénesis, etc.<sup>5,14,15</sup>.

En este sentido, se ha descrito a las plaquetas como estructuras complejas, principalmente en tres niveles: por la presencia de múltiples receptores en su membrana, por su capacidad de almacenar, sintetizar y liberar multitud de compuestos diferentes, y finalmente, por su complejo sistema de transmisión de señales que les permite responder de forma específica a cada estímulo, e integrarlos para dar lugar a distintas respuestas<sup>16</sup>. Pero además, la

plaqueta es capaz de interactuar con las células de su entorno, como los leucocitos, eritrocitos y células endoteliales, estableciendo un diálogo bidireccional con ellas<sup>17</sup>.

Todas estas características favorecen que exista un interés en las plaquetas que va más allá del campo de la hemostasia y la trombosis. En consecuencia, el estudio de la activación plaquetaria en la fisiopatología humana, la comprensión de los mecanismos bioquímicos que interviene en la misma y las posibilidades para su control farmacológico, constituye un campo de gran importancia en la investigación biomédica. Sin embargo, actualmente persisten múltiples lagunas en el conocimiento de su formación, el funcionalismo, el metabolismo, la especificidad de estímulo, los mecanismos de la regulación de su vida media, los subtipos plaquetarios, etc.

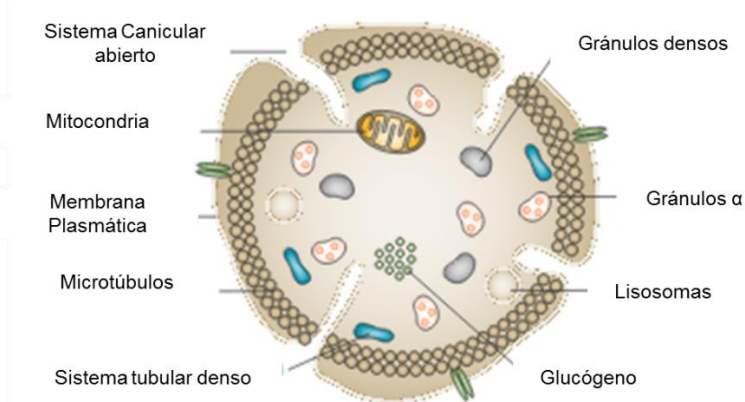
### **1.2. Las plaquetas: estructura celular y componentes moleculares**

Una persona adulta tiene un número de plaquetas circulante en sangre que oscila entre  $150-400 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , con una vida media de aproximadamente 5-9 días. Para mantener un número constante de plaquetas, se necesita por un lado que los megacariocitos produzcan alrededor de  $50-10 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}/\text{día}$ , y por otro que las plaquetas viejas sean destruidas por los fagocitos en el bazo y por las células de Kupffer en el hígado<sup>18</sup>. Cada plaqueta tiene un diámetro de 2-5  $\mu\text{m}$ , con una anchura de  $0,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$  y un volumen de  $7,06 \pm 4,85 \text{ fL}$ <sup>19</sup>.

En cuanto a su estructura celular, encontramos en la parte más externa una zona periférica o glicocalix. Es una zona rica en

glicoproteínas (Gp) que permite a la plaqueta interactuar con diferentes estructuras subendoteliales procedentes de los vasos lesionados. Es la zona por la que entra en contacto con su entorno. A continuación, se encuentra la membrana citoplasmática, la clásica bicapa lipídica con los fosfolípidos distribuidos de forma asimétrica (fosfatidil serina en la cara interna). La bicapa es capaz de reorganizarse en respuesta a un agonista plaquetario y pasar a exponer la fosfatidil serina al exterior, proporcionando una superficie plaquetaria con actividad procoagulante<sup>20</sup>. También se encuentran en la membrana las balsas lipídicas o “lipid rafts”, las cuales incluyen a diversos receptores plaquetarios, como el receptor del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>-R). Esta estructura facilita la transmisión de señales al interior de la célula<sup>21</sup>.

En la membrana citoplasmática se producen varias invaginaciones que dan lugar al sistema canicular abierto (SCA), reservorio de la membrana que le permite formar los pseudópodos durante la activación plaquetaria, y al sistema tubular denso (STD), vestigio del retículo endoplasmático liso del megacariocito (Figura 1.2). El STD almacena el Ca<sup>2+</sup> que se libera al citoplasma de las plaquetas tras la estimulación, además contiene las actividades ciclooxigenasa-1 (COX-1) y tromboxano sintetasa requeridas para la conversión del ácido araquidónico (AA) en tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)<sup>22</sup>.



**Figura 1.2. La morfología de la plaqueta.** Gránulos alfa, gránulos densos, lisosomas, mitocondria, sistema canicular abierto, sistema tubular denso, membrana plasmática, microtúbulos, glucógeno, adaptada de Martin, JF.<sup>23</sup>.

Las plaquetas en reposo mantienen su forma discoidal debido a la presencia de una banda circunferencial marginal compuesta por 7-12 anillos filamentosos. Esta banda está compuesta casi en su totalidad por microtúbulos formados por dímeros de  $\alpha\beta$ -tubulina<sup>24</sup>. También poseen un citoesqueleto compuesto por actina y miosina. Tanto los microtúbulos como el citoesqueleto son los responsables del mantenimiento de la forma en plaquetas en reposo y de formar los pseudópodos cuando las plaquetas se activan. La activación plaquetaria induce un proceso de cambio de forma y la liberación de gránulos que requiere de la polimerización/despolimerización de los microtúbulos y la reorganización del citoesqueleto<sup>25</sup>. El citoplasma de la plaqueta también contiene microfilamentos, filamentos submembranosos, glucógeno, mitocondrias, gránulos  $\alpha$  y densos y lisosomas<sup>26</sup>.

Las plaquetas son capaces de comunicarse con su entorno, entre otros mecanismos a través de la liberación del contenido de

sus gránulos que forma parte del secretoma plaquetario. Los gránulos plaquetarios son de tres tipos: gránulos  $\alpha$ , gránulos densos y lisosomas (Tabla 1.1), los cuales pueden ser liberados al medio extracelular por exocitosis como consecuencia de la estimulación plaquetaria, en un proceso conocido como reacción de liberación<sup>27</sup>.

**Tabla 1.1. Contenido de los gránulos plaquetarios**

	Factores de crecimiento y Mitógenos	Proteínas adhesivas	Factores de la coagulación y sus inhibidores	Proteasas y antiproteasas
Gránulos $\alpha$	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	FvW + pro-peptide, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, Laminin-8 ( $\alpha$ 5-laminin subunit)	Factor V/Va, XI, Multimerin, Kininógeno, Proteína S, Proteasa Anexina-1 y -2, TFPI, Inhibidor proteína C	MMP-1,-2,-4,-9, ADAMTS13, ADMS10, ADMS17 (TACE), TIMPs 1-4, Inhibidor plaquetario FIX, Inhibidor C1, $\alpha$ 1-antitripsina
	<b>Glicoproteínas de membrana</b>	<b>Quimocinas, citoquinas y otros</b>		<b>Otros</b>
	$\alpha$ Ib $\beta$ 3, $\alpha$ v $\beta$ 3, GPIb, PEAM-1, P-selectina, TLT-1, semaforina 4D, CD63, CD40L, TF, LIGHT, TRAIL, FasL, furin, GLUT3, cellubrevina, SANP23, sintaxina-2, claritina	GF- $\beta$ 1 y $\beta$ 2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8(CXCL8), MIP-1 $\alpha$ (CCL3), MIP-2(CXCL2), LIX (CXCL6), GRO- $\alpha$ (CXCL1), ENA-78 (CXCL5), SDF-1 $\alpha$ (CXCL12), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), PF4 (CXCL4), PBP, $\beta$ -TG, NAP-2, CXCL7, TARC, CCL17, angiotroperina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, bonesialoprotein, dickkopf-1, osteoprotegerin		Condroitina-4-sulfato, Albumina, Immunoglobulina G y M, Amyloid $\beta$ -precursor de proteína, Disabled-2, Complemento factor H, BSDL, Semaforina, PrPC
Gránulos densos	<b>Nucleótidos</b>	<b>Cationes</b>		<b>Aminas</b>
	ADP, ATP, AMP, GDP, GTP	Calcio, Magnesio Pirofosfato		Serotonina o 5HT, Catecolaminas
Lisosomas	<b>Proteasas ácidas</b>		<b>Glicohidrolasas</b>	
	Catepsinas, Colagenasa, Fosfatasa ácida		Heparinasa, $\beta$ -galactosidasa, LIMP, LAMP-2, $\beta$ -N-acetylhexosaminidasa (Hex)	

Los gránulos  $\alpha$  son los más heterogéneos y abundantes, alrededor de 50-80 gránulos/plaqueta, con un tamaño de 200-500 nm. Mediante análisis proteómico se han identificado cientos de proteínas, las cuales juegan un importante papel en diferentes procesos como la hemostasia, la inflamación, reparación de tejidos y las interacciones célula-matriz<sup>28</sup>. En el interior de los gránulos  $\alpha$  se almacenan factores anticoagulantes y procoagulantes, factores angiogénicos y proangiogénicos, mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, proteasas e inhibidores de proteasas. Cabe la posibilidad de que la



variedad en el contenido de los gránulos  $\alpha$  se deba a la existencia de diferentes poblaciones de gránulos con contenidos distintos. Este hecho daría explicación a la capacidad de las plaquetas de mediar en distintos procesos biológicos<sup>29</sup>. Un aspecto interesante de la liberación de los gránulos  $\alpha$  es que existen diversos estudios donde se propone que la liberación pudiese ser diferente dependiendo del estímulo, aunque éste es un tema en discusión<sup>30</sup>. Hay que tener en cuenta que algunos de los receptores más importantes para la agregación plaquetaria se encuentran, al menos en parte, en los gránulos  $\alpha$ , como el receptor integrina Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  o la P-selectina, entre otros.

Los gránulos densos son los más pequeños (150 nm) y menos abundantes, hay entre 3-6 gránulos/plaqueta<sup>26</sup>. Se forman en el megacariocito y contienen altas concentraciones de nucleótidos de adenina (653 mM de ADP y 436 mM de ATP), polifosfatos y serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT)<sup>31</sup>. Además, contienen el 70% de los cationes bivalentes, especialmente  $Ca^{2+}$ , con una concentración de 2,2 M<sup>31</sup>.

Los lisosomas plaquetarios contienen enzimas que degradan las proteínas, como pueden ser las catepsinas y las colagenasas. También se ha descrito la presencia de enzimas con capacidad para degradar los carbohidratos como la glucosidasa y la galactosidasa<sup>31</sup>.

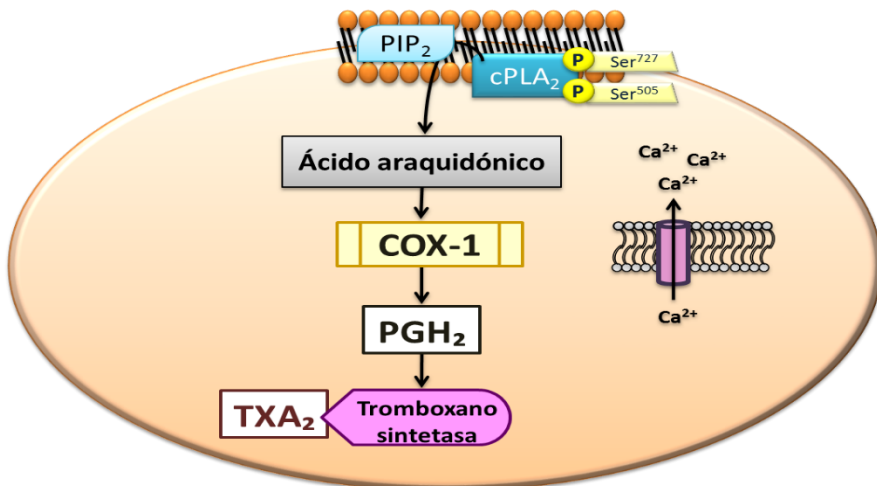
Durante la activación plaquetaria, no solo se produce la liberación del contenido de sus gránulos, sino que también se liberan otras moléculas que forman parte de su citoplasma como son los ácidos nucleicos, las micropartículas y los distintos compuestos sintetizados por la plaqueta.

Con respeto a los ácidos nucleicos en las plaquetas, como éstas son células sin núcleo, nunca se les han tenido mucho en cuenta. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que las plaquetas poseen no sólo distintos ARN mensajeros (ARNm), sino también toda la maquinaria requerida para procesar estos ARNm y sintetizar proteínas como la COX-1 o la IL-1 $\beta$ <sup>32</sup>. Además, la huella del ARNm en las plaquetas puede variar en distintas circunstancias patológicas, lo que sugiere que el análisis del perfil de ARNm en las plaquetas podría usarse con fines diagnósticos<sup>32</sup>. Las plaquetas también son una fuente importante de ARN no codificante como los micro ARN (miARN)<sup>33</sup>. Éstos pueden ser liberados por las plaquetas en distintas condiciones, transfiriéndolos a otras células y de esta manera regular su actividad génica<sup>34</sup>.

Las micropartículas de origen plaquetario son el tipo de micropartícula más abundante en la sangre, constituyendo entre un 70-90 % del total de micropartículas circulantes en sujetos sanos. Pueden actuar como un marcador de activación plaquetaria y de evolución de la enfermedad, pero también como intermediarios entre diversos tipos celulares<sup>35</sup>. Las micropartículas plaquetarias se forman constitutivamente en sujetos sanos, pero son rápidamente retiradas de la circulación, principalmente por su internalización por las células endoteliales o por quedar atrapadas en el bazo. El contenido de las micropartículas es muy variado e incluye receptores de membrana de distintos tipos, proteínas, citocinas, ácidos nucleicos y factores de la coagulación<sup>34,35</sup>.

Respecto a los compuestos que son capaces de sintetizar las plaquetas, cabe destacar al TXA<sub>2</sub> de entre todos los eicosanoides. La síntesis de eicosanoides se inicia con la liberación del AA de los

fosfolípidos de la membrana por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citoplasmática (cPLA<sub>2</sub>). Esta enzima no está inactiva cuando las plaquetas se encuentran en reposo. Para su activación, se requiere de un aumento del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. Además, la cPLA<sub>2</sub> posee varias serinas que deben ser fosforiladas para ser activa. Los residuos de la Ser<sup>505</sup> y la Ser<sup>727</sup> se fosforilan por la acción de las proteínas cinasa de mitógenos (MAPK), como es la p38 MAPK y la ERK1/2. A continuación, el AA es metabolizado por el sistema COX-1/Tromboxano sintetasa, hasta producir el TXA<sub>2</sub> (Figura 1.3)<sup>36</sup>.



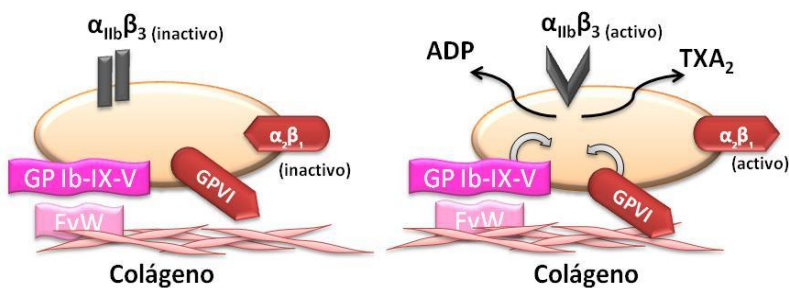
**Figura 1.3. La síntesis del TXA<sub>2</sub> en las plaquetas.** La cPLA<sub>2</sub> es activada por el aumento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y por la fosforilación de los residuos de serina (Ser<sup>727</sup> y Ser<sup>505</sup>). Una vez activada libera el ácido araquidónico de la membrana. A continuación, el sistema COX-1/Tromboxano sintetasa lo metaboliza hasta producir TXA<sub>2</sub>.

### 1.3. Secuencia de activación de las plaquetas

En condiciones fisiológicas normales, las plaquetas circulan cerca de las células endoteliales de los vasos sanguíneos sin unirse, debido a las propiedades antiadhesivas y antitrombóticas de las

células endoteliales sanas. Éstas liberan inhibidores plaquetarios como el óxido nítrico (NO) o la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) que impiden que las plaquetas se adhieran y se activen<sup>37</sup>. Pero cuando se produce un daño en la pared del vaso o la rotura de una placa de ateroma, se inicia una serie de respuestas bioquímicas y celulares que dan lugar a la activación de la hemostasia primaria.

En primer lugar, se exponen diferentes compuestos de la matriz subendotelial, como el colágeno y el Factor von Willebrand (FvW), entre otras proteínas adhesivas (laminina, fibronectina, etc.) (Figura 1.4). Las plaquetas que se encuentran circulando e inactivas reconocen estos componentes y se adhieren. Esta adhesión comienza siendo transitoria y permite que las plaquetas “ruedan” sobre la superficie. Pero esta interacción es reversible e insuficiente. Para ser estable se necesitan más contactos entre la plaqueta y el endotelio. La unión entre el receptor GPIb-IX-V al FvW y la GPVI al colágeno, permite que las plaquetas se queden unidas al endotelio dañado. Este paso facilita que la integrina  $\alpha_2\beta_1$  se active y tenga más afinidad por su sustrato, el colágeno<sup>38</sup>.

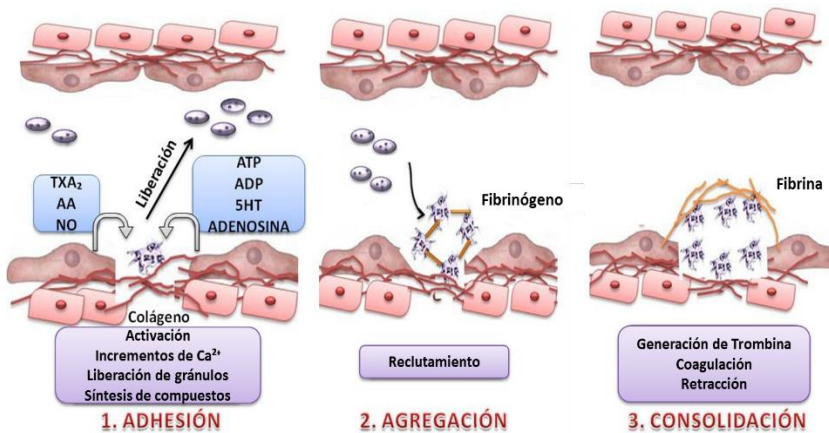


**Figura 1.4. Modelo de adhesión de las plaquetas.** El FvW y el colágeno expuesto en el endotelio capturan a las plaquetas, las cuales se adhieren y ruedan sobre el endotelio, facilitando la unión de la GPVI al colágeno y la activación de los mecanismos de transición de señales necesarios para la activación de las  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$  y estabilizar la adhesión.

## 1. Introducción

Una vez la plaqueta está firmemente adherida, se inician diversos mecanismos de transmisión de señales que incluyen la fosforilación de proteínas<sup>39,40</sup>, y se inicia la activación plaquetaria, segundo paso en la secuencia de activación<sup>16</sup>. La activación realmente empieza cuando el colágeno, potente agonista plaquetario, activa e induce la reacción de liberación en las plaquetas, dando lugar a la generación de un liberado celular compuesto, entre otras sustancias, por TXA<sub>2</sub>, AA, NO y compuestos almacenados en sus gránulos, que se liberan al medio extracelular. Este liberado actúa sobre las propias plaquetas reforzando su activación, pero también sobre otras plaquetas circulantes que mediante sus propios mecanismos de transmisión de señales, se activan y se reclutan al sitio de daño vascular. Paralelamente a la activación de las plaquetas se produce la activación de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , permitiendo la agregación plaquetaria mediada por puentes de fibrinógeno entre plaquetas contiguas<sup>41</sup>.

Adicionalmente, el daño vascular sirve como señal para el inicio de la cascada de coagulación que dará lugar a la formación de la trombina<sup>20</sup>, la cual contribuye a la activación de nuevas plaquetas y la formación de la fibrina, facilitando la consolidación del trombo (Figura 1.5).



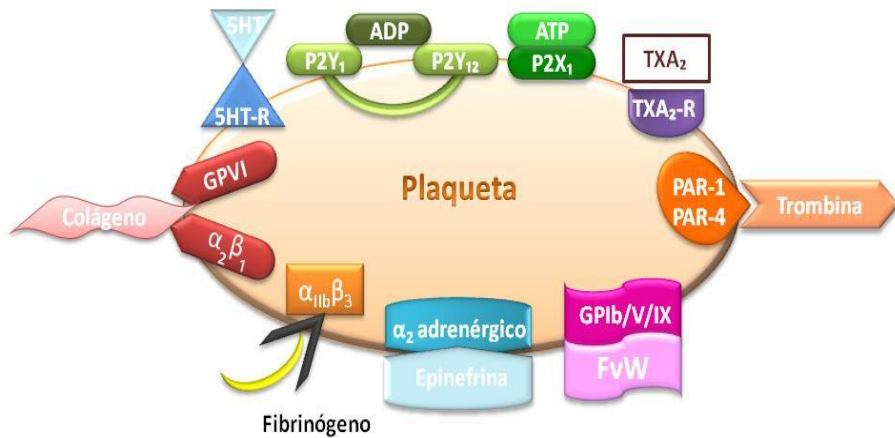
**Figura 1.5. Secuencia de formación del trombo plaquetario.** Las plaquetas se adhieren a las estructuras subendoteliales expuestas, activándose. Esta activación provoca la liberación de los gránulos. El liberado actúa sobre las plaquetas, reclutándolas al trombo en formación, y finalmente su consolidación. (AA: ácido araquidónico; NO: óxido nítrico;  $\text{TXA}_2$ : tromboxano  $\text{A}_2$ ; 5HT: serotonina).

Finalmente, a través de procesos de reorganización del citoesqueleto se produce la retracción del coágulo. Por otra parte, la activación de los procesos fibrinolíticos impide el crecimiento descontrolado del trombo.

Sin embargo, debemos tener presentes que este esquema “clásico” de formación de un tapón hemostático o de un trombo (si el proceso se descontrola), es una simplificación de un mecanismo extremadamente complejo y del que sólo empezamos a conocer algunos aspectos.

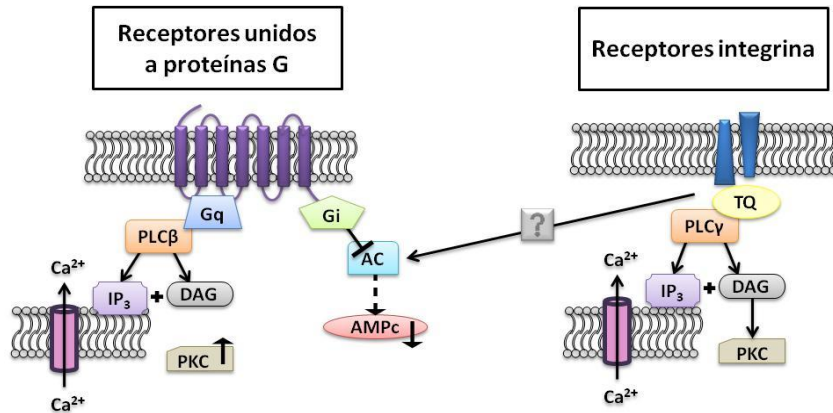
#### 1.4. Receptores plaquetarios

Las plaquetas poseen un gran número de receptores en su membrana, lo que les permite responder a una gran variedad de agonistas, tanto activadores como inhibidores (Figura 1.6).



**Figura 1.6. Receptores plaquetarios.** Receptores del colágeno (GPVI y  $\alpha_2\beta_1$ ), receptor de serotonina (5HT-R), receptores del ADP ( $P_2Y_1$  y  $P_2Y_{12}$ ), receptor del ATP ( $P_2X_1$ ), receptores de la trombina (PAR-1 y PAR-4), receptor del  $TXA_2$  ( $TXA_2-R$ ), receptor del FvW (GPIb/V/IX), receptor del fibrinógeno (Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) y receptor de la epinefrina ( $\alpha_2$  adrenérgico).

Entre los receptores plaquetarios se pueden encontrar diferentes tipos de integrinas, proteínas G acopladas a receptores de siete dominios transmembrana, diversos receptores para el ADP, proteínas que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, etc.<sup>16</sup>. Una manera de clasificar los receptores plaquetarios es dividirlos en dos grupos principales. Por una parte, los receptores con siete dominios transmembrana, asociados a proteínas G, que responden a sustancias solubles como la trombina, el ADP o el  $TXA_2$ . Por otra parte, los receptores tipo integrina, relacionados con la fosforilación de proteínas en tirosina que median en las reacciones de adhesión a proteínas como fibrinógeno o colágeno. Además, existen en la membrana diversos canales de iones como el del  $Ca^{2+}$ , etc.<sup>42</sup> (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Activación de la plaqueta mediante la transmisión de señal a través de sus receptores.** Los receptores con siete dominios transmembrana unidos a proteína G son capaces de provocar la activación de la fosfolipasa C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) a través de G $_q$  y a la vez inhibir a la adenilato ciclasa (AC) por la G $_i$  lo que se traduce en incremento de Ca $^{2+}$  y activación de la proteína cinasa C (PKC), y reducción de los niveles de AMP cíclico (AMPc). Los receptores de integrina provocan el mismo efecto empleando tirosina quinasa (TQ), y activando de la fosfolipasa C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) por fosforilación.

Aunque hemos avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos que regulan los complejos sistemas de transmisión de señales inducidos por los diferentes receptores plaquetarios, aún estamos lejos de comprender totalmente estos sistemas, lo que constituye uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

#### 1.4.1. Receptores PAR

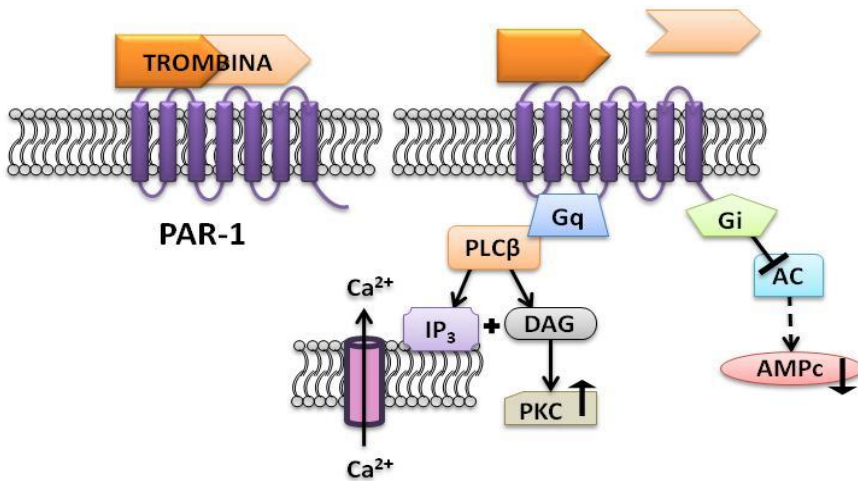
Los receptores de siete dominios transmembranas constituyen la familia de receptores más abundante en las células eucariotas. En las plaquetas abundan especialmente diferentes tipos de estos receptores, pero cabe destacar los PAR (Protease Activated Receptor)<sup>43</sup>, grupo al que pertenece el receptor de la trombina. Estos



receptores tienen la capacidad de transformar un proceso proteolítico del agonista de la parte exterior de la célula en una señal intracelular<sup>44</sup>.

Las plaquetas humanas expresan dos receptores para la trombina, PAR-1 y PAR-4. La activación de cualquiera de estos dos es suficiente para producir la secreción y la agregación plaquetaria. La trombina es el más potente activador de las plaquetas, provoca cambios de forma<sup>43,45</sup>, secreción de gránulos, síntesis de TXA<sub>2</sub>, movilización de P-selectina, exposición de CD40 a la superficie celular y activación de Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ <sup>46</sup>. Los receptores PAR se activan cuando la trombina se corta por un punto concreto del extremo N-terminal y se libera un fragmento corto. La aparición del nuevo extremo N-terminal permite su unión al receptor y generar una señal (Figura 1.8). Es interesante que el extremo N-terminal liberado es a su vez un potente agonista plaquetario, con prácticamente la misma potencia agregante que la trombina, aunque su mecanismo de acción está poco estudiado<sup>45</sup>.

Es importante conocer cómo se produce la señalización del receptor de la trombina. El receptor PAR-1 está ligado a distintas proteínas G, las cuales provocan dos respuestas principales. Por una parte, se produce la inhibición de la AC a través de Gi. Y por otra parte se produce la activación de la PLC $\beta$  mediada por Gq, lo que conduce a la generación de Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacil glicerol (DAG) que provocan el incremento de Ca<sup>2+</sup> y la activación de proteína la cinasa C (PKC)<sup>47</sup> (Figura 1.8).

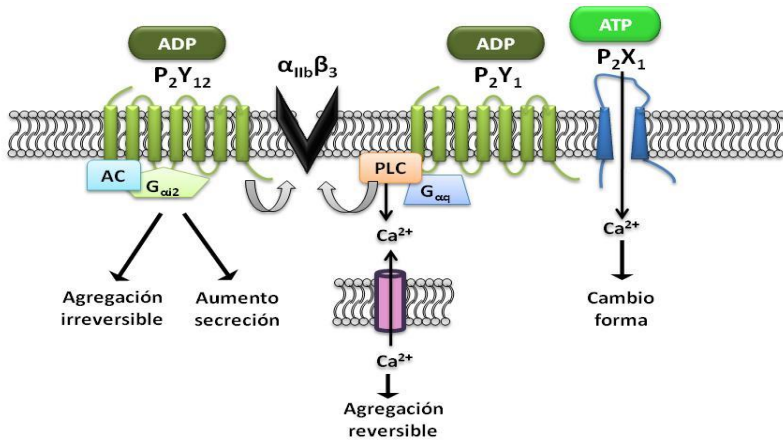


**Figura 1.8. Mecanismo de activación del receptor PAR-1 por la trombina.** La trombina al unirse al receptor PAR-1 se corta en dos extremos, el N-t (naranja oscuro) que se une al receptor y el nuevo extremo N-t (naranja claro) que se queda libre. El extremo unido al receptor activa la Gq y Gi causando la inhibición de la AC y la activación de PLCβ, respectivamente, permitiendo el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

#### 1.4.2. Receptores del ADP

El ADP es un importante agonista plaquetario primario, que es liberado por los gránulos densos de las plaquetas cuando éstas se activan<sup>48,49</sup>. Estos nucleótidos de adenina actúan sobre los receptores P<sub>2</sub>, de los cuales se han identificado tres tipos en las plaquetas, dos para el ADP: P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, y el P<sub>2</sub>X<sub>1</sub> para el ATP<sup>50</sup>. El receptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> está asociado a G<sub>ai2</sub> y provoca la inhibición de la AC mediada por el ADP<sup>51</sup>, además de jugar un papel en la activación de la Gp α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub><sup>52</sup>, en la estabilización de los agregados por la activación fosfatidil inositol 3- cinasa (PI3K)<sup>53</sup> y en la potenciación de la secreción plaquetaria<sup>54</sup>. Por su parte, el receptor P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> es capaz de producir el cambio de forma de las plaquetas, por una vía que implica la activación de PLC asociada a G<sub>αq</sub> y la posterior liberación de Ca<sup>2+</sup>. La

coactivación de  $G_q$  y  $G_i$  a través de  $P_2Y_1$  y  $P_2Y_{12}$ , respectivamente, es necesaria para obtener una agregación irreversible al ADP<sup>52</sup> (Figura 1.9).



**Figura 1.9. Receptores para el ADP y su implicación en la reactividad plaquetaria.** La plaqueta posee un receptor para el ATP ( $P_2X_1$ ) que funciona como un canal de  $Ca^{2+}$ , y dos receptores para el ADP ( $P_2Y_1$  y  $P_2Y_{12}$ ). La activación de  $P_2Y_1$  es capaz de producir una agregación parcial y reversible, siendo necesaria la activación simultánea de  $P_2Y_{12}$  para convertir esta agregación en irreversible, sin embargo, la activación exclusiva de  $P_2Y_{12}$  no es capaz de producir agregación plaquetaria.

También se ha demostrado la existencia de un tercer receptor unido a un canal de iones, el receptor  $P_2X_1$ <sup>55</sup>, responsable de la rápida entrada de  $Ca^{2+}$ , cuando es activado por el ATP<sup>56</sup>, y participando en el cambio de forma plaquetar.

### 1.4.3. Receptores tipo integrinas

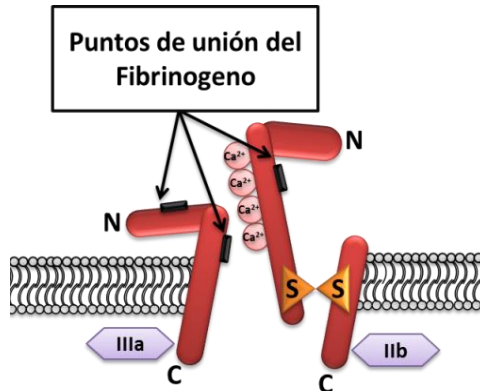
Las integrinas son los receptores de adhesión y señalización más abundantes en cualquier tipo celular<sup>57</sup>. La principal característica de estos receptores es su capacidad de actuar bidireccionalmente,

señalizando desde el interior hacia el exterior de la célula y desde el exterior hacia el interior celular.

Cuando las plaquetas están en reposo, algunas integrinas muestran una conformación inactiva, con la que no se unen a su sustrato. Requieren de un proceso de activación para poder ser funcionales que se inicia por diferentes mecanismos intracelulares, proceso que se conoce como señalización dentro-fuera. Una vez activadas, las integrinas son capaces de unirse a su ligando y generar otra señal que refuerza la activación plaquetaria, mediante el proceso de señalización fuera-dentro.

La integrina más estudiada es la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , al expresarse únicamente en plaquetas. Está formada por dos subunidades glicoproteicas la IIIa y la IIb, las cuales presentan varios sitios de unión a su sustrato. La Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  es esencial para la agregación plaquetaria al formar puentes de fibrinógeno entre plaquetas<sup>58</sup> (Figura 1.10).

En las plaquetas en reposo, la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  presenta una configuración inactiva, pero el estímulo de un agonista plaquetario activa los mecanismos de transmisión de señales conocidos como señalización dentro-fuera que conducen al cambio y activación de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , permitiendo su unión al fibrinógeno<sup>59</sup>. Esta unión permite la agregación plaquetaria y a su vez amplifica la estimulación en el proceso de señalización fuera-dentro<sup>41</sup>.



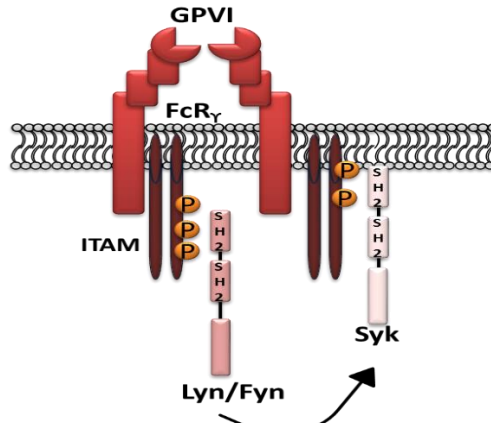
**Figura 1.10. Estructura de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .** Este receptor está formado por dos cadenas glicoproteínas, IIIa ( $\beta_3$ ) y IIb ( $\alpha_{IIb}$ ). Cada una de ellas presenta distintos puntos de unión al fibrinógeno y una zona de unión del  $Ca^{2+}$ . Sitios claves para la función de la integrina.

#### 1.4.4. Receptores del colágeno

Como ya se ha comentado, el colágeno subendotelial es una molécula clave en la activación plaquetaria. Hay tres receptores implicados en la respuesta plaquetaria al colágeno: el complejo GPIb-IX-V, el cual se une al colágeno vía FvW, la  $\alpha_2\beta_1$  y la GPVI, las cuales se unen directamente al colágeno<sup>60</sup>.

De todos los receptores del colágeno cabe destacar a la GPVI, al ser clave en la adhesión plaquetaria al endotelio. La GPVI es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas con dos dominios extracelulares (Figura 1.11). La GPVI se asocia de forma no covalente con el complejo FcR $\gamma$ , necesario para la señalización. La activación de este receptor requiere de un paso muy importante como es la fosforilación del dominio ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), que se encuentra en el dominio citoplasmático. La fosforilación por las tirosinas cinasas Fyn y

Lyn, producen el reclutamiento y activación de la tirosina cinasa Syk necesaria para iniciar los mecanismos de transmisión de señales<sup>61</sup>.



**Figura 1.11. Activación de la GPVI.** La unión del colágeno al complejo GPVI-FcR $\gamma$  produce la fosforilación de su dominio ITAM por las tirosinas cinasa Fyn y Lyn, y el reclutamiento y activación de la tirosina cinasa Syk. Activándose la transmisión de señales.

### 1.5. Modificaciones postraduccionales de las proteínas: acetilación

Al carecer de núcleo y por tanto, de la capacidad de sintetizar proteínas de *novo* (aunque en los últimos años se está poniendo en cuestión este dogma<sup>62</sup>), las plaquetas han sido tradicionalmente empleadas como modelo para el estudio de las modificaciones postraduccionales o de los mecanismos de transmisión de señales, entre otros. Además, la plaqueta presenta la ventaja frente a otros tipos celulares de tener la capacidad de responder de manera muy rápida a un estímulo, tanto activador como inhibidor, y por lo tanto es relativamente fácil y rápido determinar las distintas respuestas funcionales, como la agregación plaquetaria, la liberación de

gránulos, la síntesis de compuestos, los procesos adhesivos, etc., así como los mecanismos de transmisión de señales que los regulan.

Uno de los mecanismos de transmisión de señales más importantes y estudiados son las modificaciones postraduccionales de proteínas. Las proteínas, tanto las plaquetarias como las de cualquier tipo celular pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales, que pueden alterar su función. Estas modificaciones pueden ser de naturaleza muy variada: oxidaciones, glicosilaciones, proteólisis, unión de moléculas lipídicas, unión covalente de proteínas pequeñas como la ubiquitina, fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, etc. Las distintas modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las proteínas potencialmente podrían dar lugar a más de un millón de variantes diferentes, frente a los aproximadamente 20.000 genes codificantes de proteínas que encontramos en el genoma humano. Esta interacción entre genotipo y fenotipo, reflejada en las distintas modificaciones postraduccionales que puede sufrir una proteína, supone un prometedor campo de estudio como se verá en esta Tesis.

Probablemente entre las distintas modificaciones postraduccionales, una de las más estudiadas en las plaquetas y con más implicaciones funcionales es la fosforilación de proteínas, tanto en residuos Tyr como Ser/Thr, así como las distintas enzimas (quinasas y fosfatasas) que regulan estos procesos<sup>36,39,40</sup>.

Una de las modificaciones de proteínas que ha recibido más atención en los últimos años es la acetilación. Sin embargo, hasta hace poco, este tipo de modificación había recibido poca atención con respecto a las plaquetas (excepto en lo referente al

megacariocito<sup>63</sup>), ya que parecía afectar específicamente a histonas, y por tanto poco relacionado con la función plaquetaria. Como veremos más adelante, y de forma muy reciente, el campo de la acetilación como modificación postraducciona de proteínas ha crecido exponencialmente, y su estudio va a constituir uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral.

### 1.5.1. Acetilación de histonas

Las histonas suelen estar cargadas positivamente debido a los grupos amino presentes en los residuos de lisina (Lys) y arginina. Estas cargas positivas afianzan la interacción con las cargas negativas de los grupos fosfato del esqueleto carbonado del ADN, permitiendo de esta forma la compactación. La acetilación de los grupos amino de las Lys neutraliza las cargas positivas de las histonas, impidiendo la capacidad de las histonas para unirse al ADN. Esta disminución de la afinidad favorece una conformación “abierta” de la cromatina y facilita la expresión genética de esa región cromosómica, permitiendo el acceso a la misma de los factores de transcripción<sup>64</sup>.

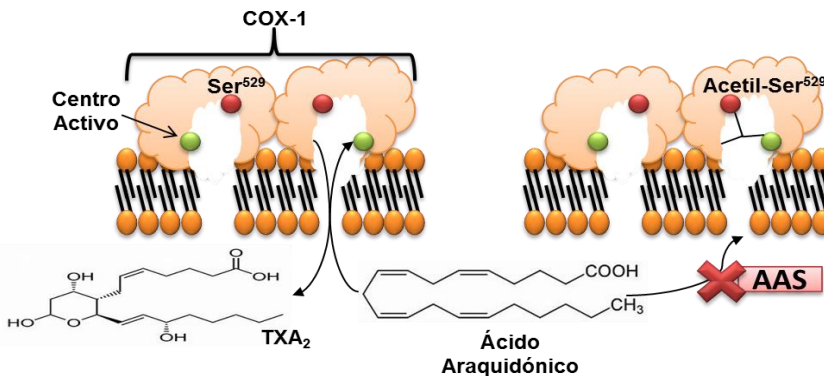
Por su parte, las histonas deacetilasas (HDAC) eliminan los grupos acetilo, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas al ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN e impide la expresión génica. Este proceso se ha observado en la formación de nuevas plaquetas a partir del megacariocito, lo que podría explicar la trombocitopenia asociada a algunos tratamientos reguladores de la acetilación de histonas en distintos tipos de cáncer<sup>65</sup>.



### 1.5.2. Acetilación de proteínas no histonas

No es hasta el año 2010 cuando se describió que la acetilación era la modificación postraduccional más común en los eucariotas y además altamente conservada en el árbol evolutivo<sup>66</sup>. Este hecho es indicativo de la existencia de una alta presión selectiva para mantener esta modificación postraduccional<sup>67</sup>. La acetilación es un proceso de modificación postraduccional reversible y altamente regulado que provoca un cambio que puede alterar la función de la proteína. Ésta tiene lugar en distintos aminoácidos, pero cabe destacar de entre todos ellos la acetilación de la Lys<sup>68,69</sup>. Las enzimas responsables de la adición o eliminación del grupo acetilo en las proteínas dianas, se conocen como las histonas Acetil transferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC)<sup>70</sup>.

Las modificaciones postraduccionales como la acetilación pueden tener lugar tanto por mecanismos enzimáticos como no enzimáticos. Por ejemplo, en el campo de la enfermedad cardiovascular, la acetilación más estudiada es, sin lugar a duda, la inducida por el tratamiento con AAS sobre la COX-1 en las plaquetas<sup>71,72</sup>. El AAS acetila a una serina (Ser<sup>529</sup>) y provoca la inhibición irreversible de la síntesis de TXA<sub>2</sub> al bloquear el acceso al centro activo de su sustrato, el AA (Figura 1.12)<sup>73</sup>. Por tanto, la acetilación de la COX-1 por el AAS es una modificación postraduccional inducida por un mecanismo no enzimático<sup>74</sup>.



**Figura 1.12. Inhibición de la COX-1 por el AAS.** La acetilación de una serina que se encuentra en el centro activo de la COX-1 provoca la inhibición irreversible de la síntesis del TXA<sub>2</sub> al impedir el acceso del AA.

En la última década, el conocimiento sobre las modificaciones postraduccionales relacionadas con la acetilación de proteínas ha crecido de manera exponencial. No solo se han observado estas modificaciones en las histonas, sino que también en factores de la transcripción, en enzimas que regulan el metabolismo e incluso en proteínas que participan en la transmisión de señales. Por ello, la acetilación de las Lys se ha convertido en un importante rival de la fosforilación en cuando a la modificación postraduccionales de proteínas<sup>75</sup>.

En un estudio germinal realizado por Choudhary *et al.*<sup>68</sup>, en el que se empleó un enfoque proteómico, se identificaron más de 3.500 puntos de acetilación en aproximadamente 1.700 proteínas distintas procedentes de hepatocitos. Este hecho ha dado lugar a la aparición de un nuevo concepto, el de “acetiloma” de la célula, de forma que la acetilación de proteínas podría llegar a tener una importancia y complejidad semejante a la fosforilación de proteínas y sus implicaciones en la funcionalidad celular<sup>75,76</sup>.

Además, debido al reciente descubrimiento de que en muchas proteínas los puntos de fosforilación y las Lys susceptibles de ser acetiladas se encuentran próximos, se ha sugerido que puede existir algún tipo de cooperación o interferencia entre estas dos vías de transmisión de señales<sup>75</sup>. Hoy en día, ya se han identificado más de 4.000 sitios de fosforilación que podrían estar influenciados por la acetilación de una Lys cercana. Un ejemplo lo encontramos en la histona H3, se ha descrito la existencia de una interferencia positiva entre la acetilación de la Lys<sup>40</sup> y la fosforilación de la Ser<sup>10</sup>, aminoácidos cercanos<sup>77</sup>.

Uno de los campos donde más se ha estudiado la acetilación de las proteínas no histonas es en el metabolismo intermedio<sup>78</sup>. Se ha descubierto en células hepáticas humanas, que muchas de las enzimas que participan en el metabolismo pueden estar modificadas por la acetilación, incluyendo enzimas que participan en distintas rutas como la glucólisis, la gluconeogénesis, el ciclo del Krebs, el ciclo de la urea, el metabolismo de los ácidos grasos, el metabolismo del glucógeno, etc.<sup>79</sup>.

El citoesqueleto es otra familia de proteínas no histonas que se encuentran modificadas por la acetilación. Las proteínas del citoesqueleto desempeñan un papel importante en distintos procesos celulares como el mantenimiento de la forma celular, el transporte intercelular, la división celular, la movilidad, etc. Un ejemplo de la importancia de la acetilación en el citoesqueleto se da en la cortactina. Ésta se puede acetilar por p300 en nueve sitios distintos e inhibir así su unión a la actina, lo que provoca un efecto directo sobre la movilidad celular. Este proceso es revertido por la deacetilación de la cortactina por las deacetilasas SIRT1 o HDAC<sup>66</sup>.

### 1.5.3. Regulación de la acetilación de proteínas y clasificación de las acetilasas y deacetilasas

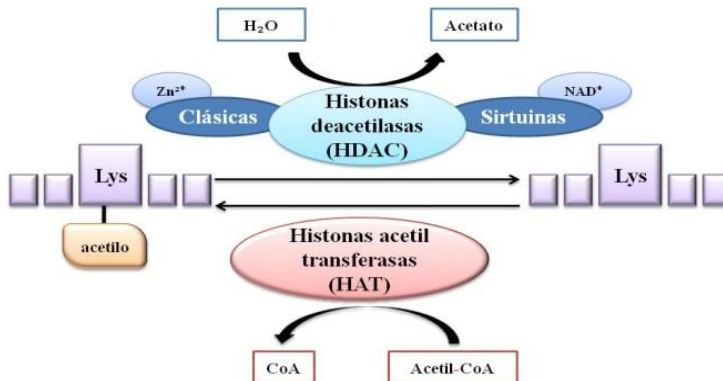
El nivel de acetilación de los residuos de Lys en las proteínas está determinado por el equilibrio entre las enzimas que añaden grupos acetilos, las HAT y las que los eliminan, las enzimas con actividad deacetilasa, las HDAC<sup>80</sup>. La acetilación de la Lys neutraliza la carga positiva de este aminoácido, alterando la función de la proteína. El grupo acetilo procede del acetil Coenzima A (acetil-CoA)<sup>66</sup>, molécula clave en el metabolismo, lo que podría justificar el papel que parece jugar la acetilación de proteínas en la regulación del metabolismo.

Con respecto a las HAT, éstas se pueden clasificar de diversas maneras según su localización subcelular. Están las de clase A nucleares, que son las encargadas de transferir el grupo acetilo del acetil-CoA al  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la cola N terminal de las histonas. Y las de clase B citoplasmáticas que también utilizan el acetil-CoA como dador del grupo para acetilar al  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys de diversas proteínas citoplasmáticas<sup>70</sup> (Tabla 1.2). Las HAT también se pueden clasificar según su sustrato, agrupándose en tres grandes familias: la familia GNAT, la familiar MYST y la familia p300/CBP (proteína de unión CREB)<sup>66,81</sup>.

**Tabla 1.2. Clasificación de las HAT**

HAT	
Clases	Localización
Tipo A	Núcleo
Tipo B	Citoplasma

Por otro lado, las HDAC se pueden agrupar en dos familias dependiendo del mecanismo de catálisis<sup>82</sup>. Las HDAC clásicas, dependientes de zinc ( $Zn^{2+}$ ) como cofactor, que incluyen a las clases I, II y IV. Y las sirtuinas o Clase III, dependientes del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido ( $NAD^+$ )<sup>83</sup>. De nuevo una molécula central en el metabolismo como es el  $NAD^+$  aparece como clave para la regulación de las HDAC (Figura 1.13). Tanto las HDAC como las sirtuinas son capaces de participar activamente en la regulación del metabolismo y el control de la energía celular, a través del acetyl-CoA y del estado redox, con el  $NAD^+$ <sup>84</sup>.



**Figura 1.13. Clasificación de las histonas deacetilasas.** Las histonas deacetilasas (HDAC) se clasifican en dos familias: las clásicas dependientes de  $Zn^{2+}$  y las sirtuinas dependientes del cofactor  $NAD^+$ . La molécula dadora del grupo acetilo es el acetyl-CoA.

En los seres humanos se ha demostrado, de momento, la presencia de 18 enzimas deacetilasas: las histonas deacetilasas de la HDAC1 a la HDAC11 y las sirtuinas (SIRT) de la SIRT1 a la SIRT7<sup>83</sup>. Todas ellas son responsables de la eliminación de los grupos acetilo, manteniendo de esta forma el equilibrio en el nivel de acetilación de las distintas proteínas. La mayoría de las HDAC

clásicas, a excepción de las HDAC6, 10 y 11, se encuentran localizadas en el núcleo. Por el contrario, las sirtuinas se encuentran ampliamente representadas en el citoplasma, como la SIRT1 y SIRT2, y en las mitocondrias, como la SIRT3 y SIRT5, lo que sugiere un papel más allá del control de la acetilación de las histonas<sup>80</sup> (Tabla 1.3).

Para poder diferenciar las HDAC clásicas de las sirtuinas se utilizan distintos inhibidores de su actividad deacetilasa, como el inhibidor de las HDAC el trichostatin A (TSA), capaz de inhibir todas las HDAC<sup>85</sup>, excepto las sirtuinas. En cambio, éstas últimas se inhiben en presencia de nicotinamida (NAM), que bloquea la unión del cofactor NAD<sup>+</sup>, o por medio de diversos inhibidores específicos como el cambinol (CAM)<sup>86</sup>.

**Tabla 1.3. Clasificación de las HDAC**

HDAC		
Clases	Miembros	Localización
I	HDAC1	Núcleo
	HDAC2	Núcleo
	HDAC3	Núcleo
II A	HDAC4	Núcleo/Citoplasma
	HDAC5	Núcleo/Citoplasma
	HDAC7	Núcleo/Citoplasma /Mitocondria
	HDAC9	Núcleo/Citoplasma
II B	HDAC6	Citoplasma
	HDAC10	Citoplasma
IV	HDAC11	Citoplasma

Clase	Miembros	Localización
III (Sirtuinas)	SIRT1	Núcleo / Citoplasma
	SIRT2	Citoplasma
	SIRT3	Núcleo / Mitocondria
	SIRT4	Núcleo / Mitocondria
	SIRT5	Núcleo / Mitocondria
	SIRT6	Núcleo
	SIRT7	Núcleo

#### 1.5.4. Procesos celulares regulados por la acetilación

La acetilación es una modificación postraduccional que participa en diversos procesos celulares. Como hemos visto, el más conocida es la acetilación de histonas, por estar estrechamente relacionado con la expresión génica<sup>64</sup>. Por otro lado, hay evidencias de la participación de la acetilación en otros procesos nucleares como el ciclo celular, la remodelación de la cromatina, la replicación y transcripción del ADN e incluso en el transporte nuclear. También existen estudios en los que la acetilación participa en procesos citoplasmáticos, como es la reorganización del citoesqueleto y la movilidad celular<sup>68</sup>. Se sabe que el estado dinámico de acetilación o deacetilación de las proteínas está íntimamente relacionado con el envejecimiento y con distintas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, etc.<sup>70</sup>. Sin embargo, y con la excepción de la acetilación no enzimática de la COX-1 por el ASA, nada se sabe del papel jugado por la acetilación de proteínas en la regulación de la función plaquetaria, lo que constituye el principal objetivo de la presente Tesis.

#### 1.6. Factores transcripcionales en las plaquetas

Como ya se ha comentado, una de las principales características de la plaqueta es que no poseen núcleo, por ello tradicionalmente se les ha considerado incapaces de realizar expresión génica regulada por factores transcripcionales, ni sintetizar algún tipo de proteína. Pero en la década de los 60, Warshaw *et al.*<sup>87</sup> realizaron un estudio en el que demostraron la capacidad de las

plaquetas de sintetizar algunas proteínas de *novo*. En el estudio se utilizó el aminoácido leucina marcado con carbono 14 ( $[^{14}\text{C}]$ leucina), y se observó que conforme se oxidaba la glucosa, las plaquetas incorporaban este aminoácido marcado. Mediante la utilización de un inhibidor de la síntesis proteica, como es la puromicina, se comprobó que la incorporación del aminoácido marcado se reducía. Esta observación fue el primer indicio de que las plaquetas podían sintetizar proteínas.

Al poco tiempo, aparecieron nuevos trabajos en los que se demostraba que la plaqueta poseía ARNm estable y que a partir de éste se sintetizaban nuevas proteínas<sup>88</sup>. Actualmente, ya se sabe que las plaquetas contienen los mecanismos necesarios para procesar y traducir su propio transcriptoma a proteínas. En el caso de la plaqueta son más de 6.000 transcritos<sup>89</sup>, de los cuales sólo una pequeña fracción se ha demostrado que puede traducirse a proteína, aunque la lista crece cada día.

Recientemente se descubrió la presencia de diversos factores de transcripción en la plaqueta (Tabla 1.4), lo cual resulta sorprendente si la plaqueta no tiene actividad transcripcional<sup>90</sup>. En un primer momento se pensó que la presencia de factores de transcripción en las plaquetas era debido al azar, es decir, cuando los megacariocitos forman plaquetas nuevas arrastran con ellas parte de su contenido y con ello a los factores. Pero pensar que este proceso es debido simplemente al azar es un argumento "simple", ¿por qué las plaquetas gastarían energía en transportar una proteína que no tuviera ninguna función?



Actualmente se sabe que factores de la transcripción de las plaquetas juegan papeles muy importantes y relevantes en la regulación de la función plaquetaria<sup>91</sup>. Pero no solo eso, diversos estudios han demostrado que las plaquetas son capaces de transferir sus factores de transcripción a las células vasculares o inmunológicas, a través de las micropartículas<sup>90</sup>. Este método de comunicación puede ser un mecanismo muy importante, ya que los factores de transcripción de las plaquetas podrían, de esta forma, participar en la regulación de la inflamación y la inmunidad, controlando la expresión génica en otros tipos celulares.

**Tabla 1.4. Factores de transcripción en las plaquetas**

Factores de transcripción	
p65	RXR $\alpha$
PPAR $\gamma$	GR
PPAR $\beta$	AHR
LXR $\beta$	STAT3

### 1.6.1. STAT3

El factor de transcripción STAT (signal transducer and activator of transcription) es la primera familia de proteínas que se ha identificado como factor de transcripción con funciones relevantes en la función plaquetaria<sup>92</sup>, independientes de su papel como factor de transcripción.

Los factores de transcripción STAT son una familia de proteínas estructural y funcionalmente muy conservada. Todas conservan diversos dominios comunes. Empezando por la región amino terminal, se encuentra en primer lugar el dominio N-terminal

(NTD), seguido del dominio “colied-coil” (CCD), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio de unión (LINKER) y el dominio SH2. La especificidad de cada STAT se encuentra en la región carboxilo terminal, en el dominio de activación transcripcional (TAD), sitio de acetilación<sup>93</sup>. El dominio más conservado es el SH2 que tiene un importante papel en la señalización al fosforilarse de manera específica (Figura 1.14).



**Figura 1.14. Estructura del STAT y sus dominios más importantes.** Los dominios más importantes son: NTD, dominio N terminal; el CCD, dominio “coiled coil”; el DBD, sitio de unión al ADN; el dominio de unión LINKER y el dominio SH2, sitio de fosforilación. Por el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio de actividad transcripcional TAD, sitio de acetilación.

Esta familia STAT está formada por siete proteínas estructural y funcionalmente relacionadas: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a/b y STAT6. Se ha descrito que los diferentes miembros de la familia STAT pueden tener funciones muy diversas como la regulación de la expresión de genes relacionados con la homeostasis celular, el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la respuesta inmune<sup>94</sup>. Las STAT se regulan por diversas modificaciones postraduccionales, las cuales se producen a los pocos minutos de la estimulación, y se eliminan rápidamente por enzimas<sup>95</sup>.

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes de las STAT, es la fosforilación en sus residuos de Tyr y Ser del dominio SH2. Esta modificación se relaciona con la activación transcripcional de la proteína. Tradicionalmente, se ha considerado que STAT es activo cuando se fosforila y homodimeriza, de esta

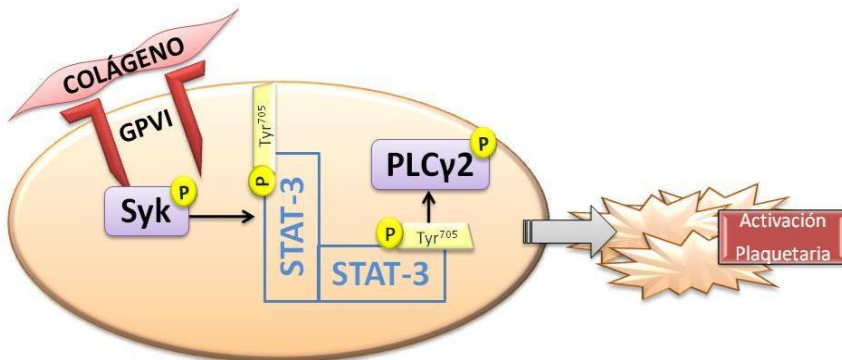
manera es capaz de trasladarse al núcleo y actuar como factor de transcripción<sup>94</sup>.

Un ejemplo de esta función la encontramos con el STAT3 y su papel en los megacariocitos. Diversas citoquinas como la trombopoyetina (TPO) se unen a su receptor en el megacariocito el (c-Mlp), provocando la activación de la cinasa Janus (JAK), la cual induce la activación de STAT3 mediante la fosforilación del dominio SH2. La fosforilación favorece el cambio conformacional y permite la dimerización de STAT3, así es capaz de translocarse al núcleo y regular la transcripción de genes implicados en la producción de nuevas plaquetas<sup>92</sup>.

Durante el proceso de formación de las plaquetas, éstas arrastran consigo parte de la maquinaria de su progenitora, entre otras cosas los factores de transcripción, como ya se ha comentado. Se ha descrito la presencia de diversas STAT en plaquetas circulantes, como son: STAT1, STAT2, STAT3 y STAT5<sup>96</sup>. El primer indicio de que los factores de transcripción eran importantes en las plaquetas maduras se descubrió al tratar las plaquetas con TPO. El TPO no es capaz de producir agregación plaquetaria directa, pero sí que puede actuar como *primer*, potenciando la agregación plaquetaria de otros agonistas como la epinefrina<sup>97</sup>. Este estímulo produce la fosforilación de diversos factores transcripcionales como STAT3 y STAT5<sup>97</sup>. Este hecho indica la implicación de los factores de transcripción en los mecanismos de transmisión de señales inducidos por el TPO en las plaquetas. Posteriormente, usando la técnica de inmunodetección de proteínas fosforiladas se observó que la Leptina, un factor de crecimiento, potencia la agregación plaquetaria al ADP y la síntesis de TXA<sub>2</sub>. Pero no solo eso, también es capaz de producir

fosforilación de diversas proteínas plaquetarias como JAK2 y STAT3<sup>98</sup>. Estos descubrimientos indican la importancia de los factores de transcripción en las plaquetas.

Recientemente, se ha investigado el papel de STAT3 en las plaquetas. El STAT3 participa en el mecanismo de transmisión de señales a través del receptor del colágeno, la GPVI<sup>99</sup>. La unión del colágeno a su receptor provoca la fosforilación y activación de la tirosina cinasa Syk (Syk). A su vez, ésta es capaz de fosforilar STAT3 facilitando su dimerización y activación. STAT3 activado, actúa como punto de unión con la PLC $\gamma$ 2, es decir, la fosforila y la activa, facilitando la activación plaquetaria (Figura 1.15).



**Figura 1.15. La fosforilación de STAT3 está mediada por el colágeno en las plaquetas.** El colágeno se une a su receptor el GPVI e induce la fosforilación y activación de la cinasa Syk. Ésta a su vez fosforila a STAT3 facilitando su dimerización y activación. STAT3 fosforilada es capaz de activar a la PLC $\gamma$ 2 y facilitar la activación plaquetaria.

Estos resultados son indicativos de que los factores de transcripción en las plaquetas tienen una función, es decir participan activamente en los mecanismos de transmisión de señales implicados en la funcionalidad plaquetaria. Por ello, profundizar en los mecanismos regulados por STAT3 en los mecanismos de

transmisión de señales en las plaquetas es uno de los principales objetivos de esta Tesis.

Sin embargo, han surgido evidencias que revelan que la fosforilación de las STAT y su actividad pueden estar desacopladas. Esta alteración se debe al efecto de otras modificaciones postraduccionales como la acetilación<sup>95</sup>. Se conoce que existe una asociación entre las proteínas STAT y las HAT. Esta unión incluye a enzimas como las acetiltransferasas: p300/CBP, GCN5 y P/CAF<sup>100,101</sup>. Los siete miembros de la familia STAT son capaces de unirse a p300/CBP por su extremo carboxilo terminal, a pesar de ser el dominio menos conservado<sup>102</sup>.

En los miocitos, células cardíacas, se ha observado que STAT3 se acetila en respuesta a varias citoquinas, provocando la acetilación de varias Lys de la región carboxilo terminal y del TAD. Parece ser que la acetilación de STAT3 se relaciona mayoritariamente, aunque no exclusivamente, con una regulación positiva de su actividad. Además, la acetilación de STAT3 incrementa su estabilidad<sup>103</sup>. El principal sitio de acetilación de STAT3 se encuentra en la Lys<sup>685</sup> localizada en el dominio TAD de la región carboxilo terminal, sitio de unión de las HAT. La acetilación de STAT3 en la Lys<sup>685</sup> es necesaria para su dimerización, translocación al núcleo y así poder unirse al ADN para realizar su actividad transcripcional. Esta modificación es tan importante como la fosforilación de la Tyr<sup>705</sup>, ambas regulan la actividad de STAT3. Existen evidencias de que la acetilación de STAT3 se asocia con un aumento de la fosforilación del factor, siendo ambas las modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de STAT3<sup>102</sup>.

## 1. Introducción

Por ello, uno de los objetivos de esta Tesis es estudiar las modificaciones postraduccionales que puede tener el factor de transcripción STAT3 en las plaquetas, y conocer las implicaciones de estas modificaciones en la función plaquetaria.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **HIPÓTESIS:**

La activación plaquetaria en respuesta a diferentes estímulos es un proceso complejo en el que participan diversos mecanismos de transmisión de señales. Muchos de estos mecanismos son muy complejos, y algunos no completamente comprendidos.

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas (fosforilaciones, glicosilaciones, ubiquitinizaciones, etc.) son uno de los procesos más importantes en los mecanismos de transmisión de señales en distintas células, incluyendo las plaquetas. Recientemente se ha empezado a poner de manifiesto el papel jugado por la acetilación de proteínas no histonas como mecanismo de transmisión de señales. Sin embargo, no se tiene conocimiento sobre la existencia de procesos enzimáticos de la acetilación/deacetilación de proteínas no histonas en las plaquetas o sus implicaciones funcionales. En la presente Tesis Doctoral hipotetizamos, en primer lugar, que la regulación de la acetilación de proteínas plaquetarias constituye un nuevo mecanismo de transmisión de señales implicado en la regulación de la función plaquetaria.

La presencia de factores de transcripción en una célula anucleada como la plaqueta, es un hecho inesperado que ha dado lugar a la aparición de muchas especulaciones sobre su papel en las respuestas de las plaquetas. Se ha sugerido que STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) puede estar ligado a la transmisión de señales a través del receptor del colágeno GPVI. Sin embargo, estos estudios no han tenido en cuenta la importante vía

de amplificación de señales que constituye la síntesis de TXA<sub>2</sub> por las plaquetas. Hipotetizamos, en segundo lugar, que STAT3 está implicado en las vías de señalización plaquetaria inducidas por TXA<sub>2</sub>.

### **OBJETIVOS:**

**1. Estudiar la presencia de proteínas acetiladas (acetiloma) en plaquetas humanas.** Se pretende estudiar el patrón de proteínas acetiladas en plaquetas en reposo, el efecto sobre el acetiloma de la activación plaquetaria inducida por diversos agonistas fisiológicos y las posibles modificaciones por la utilización de distintos inhibidores de las HDAC clásicas o de las sirtuinas.

**1.1. Estudiar la regulación de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en plaquetas.** Se estudiará el efecto de la activación plaquetaria sobre la acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina, y la importancia de este mecanismo sobre la función plaquetaria.

**2. Estudiar la posible implicación de la acetilación/deacetilación de proteínas en distintas respuestas plaquetarias.** Se emplearán inhibidores específicos de los distintos tipos de HDAC clásicas y sirtuinas, para estudiar el efecto sobre diversas respuestas plaquetarias: agregación plaquetaria, liberación de gránulos densos, movimientos de Ca<sup>2+</sup> y los mecanismos de transmisión de señales implicados.

**2.1. Estudiar la presencia de distintas deacetilasas (HDAC clásicas y sirtuinas) en las plaquetas.**

**3. Explorar los mecanismos de transmisión de señales regulados por procesos de acetilación/deacetilación de proteínas.**

**4. Analizar la acetilación de proteínas plaquetarias por el AAS.** Mediante la utilización del AAS como agente acetilante se estudiará la posible acetilación de otros sustratos diferentes de la COX-1, especialmente de la  $\alpha$ -tubulina, y sus posibles implicaciones funcionales.

**5. Estudiar la participación de STAT3 en la transmisión de señales inducida por el TXA<sub>2</sub>.** Específicamente se profundizará en las distintas modificaciones postraduccionales del factor de transcripción STAT3 y su participación en los distintos mecanismos de transmisión de señales implicados en la respuesta plaquetaria a diferentes agonistas.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Equipos

Agregómetro y Lumi-agregómetro de doble canal Modelo 700 (Chrono-log Corp, Pa, EEUU) y programa AGGRO/LINK™8 Versión 1.2.9 (BioTop Medical Leiden, Holanda).

Centrífuga Eppendorf 5417R, centrífuga Eppendorf 5810R; minispin plus (Brinkman Instruments, NY, EEUU).

Contador de centelleo líquido gamma (Packard, Auto-Gamma Scintillation Spectrometer 530, EEUU); contador de centelleo LKB (LKB, Rackbeta, Finlandia).

Baño de agua termostatzado (Izasa, Valencia, España); baño seco Accublock Digital Dry Bath (Labnet Internatiol, Inc, EEUU).

Contador de células Beckman Coulter Ac.T diff (Beckman Coulter Co., Madrid, España).

pH-metro (Crison Instruments, Barcelona, España).

Balanza Sartorius BA 1105 (Sartorius-Instruments Ltd., Surrey, EEUU).

Cubeta de electroforesis (geles 14x14 cm) (CBS, CA, EEUU); cubeta de electroforesis y sistema de transferencia (geles 8x8 cm) (Invitrogen, Paysley, RU).

Sistema de transferencia sumergido y sistema de transferencia semi-seco (Invitrogen, Paysley, RU).

Procesador de películas (Curix60 AGFA Heathcare, Alemania); sistema de imagen molecular automático Amersham Imagen 600 (Healthcare Life Science, Alemania).

Lector de placas de absorbancia MRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo Labsystems, EEUU).

Espectrofluorofotómetro RF-1501 (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Microscopio confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

Citómetro de flujo XL-MCL con el programa System II (3.0) (Beckman Coulter, Madrid, España).

LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Roche Ciencias Aplicadas, Barcelona, España).

Ordenador Asus con Microsoft Office 2010 y programa de estadística SPSS 20.0.

#### 3.2. Material

Barras agitadoras magnéticas cubiertas de teflón y cubetas de agregación plaquetaria de vidrio siliconadas (Chronolog Co., PA, EEUU) y cubetas de cuarzo,

Micro-jeringas Hamilton (Hamilton, NV, EEUU), pipetas Pasteur automáticas y puntas desechables Gilson (Gilson Medical Electronics, Francia).

Sistema vacutainer de extracción de sangre (Becton Dickison and Company, NY, EEUU) y tubos de sangre Vacuette de citrato de sodio 3.2% (Greiner Bio-One, Madrid, España).

Filtros Millipore de 45 y 22  $\mu\text{m}$  Durapore (Millipore-Waters, MA, EEUU).



Tubos desechables de polipropileno de varios tamaños (Eurotubo, Deltalab, Afora, España).

### 3.3. Reactivos

#### 3.3.1. Inductores de la activación plaquetaria

La trombina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se prepara como solución stock a una concentración de 100 Unidades NIH/mL, con suero fisiológico como solvente. La solución stock se conserva a -80°C hasta su utilización.

La suspensión comercial de colágeno fibrilar Hormon-Chemie (Nycomed, Alemania) se diluye al principio del experimento para obtener la concentración apropiada, utilizando como solvente la solución SKF proporcionada por la firma comercial. Esta consiste en una solución glucosada a pH 2,5. La solución stock se conserva a 4°C hasta su utilización en el mismo día.

Los análogos estables del TXA<sub>2</sub>, el U46619 (9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethano-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y el IBOP ([1S-(1 alpha,2 beta(5Z),3 alpha(1E,3R),4 alpha)]-7-[3-(3-hydroxy-4-(4'-iodophenoxy)-1-butenyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-h eptenoic acid) (Cayman Chemicals, EEUU), se preparan como solución stock en etanol absoluto, y se conservan a -80°C hasta su utilización. El U46619 y el IBOP se diluyen hasta la concentración de trabajo con suero fisiológico.

El ADP (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se prepara a una concentración stock de 240  $\mu$ M disolviendo el producto en tampón PBS

(13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4). Se mantiene en pequeñas alícuotas a -20°C.

El ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), molécula que incrementa el Ca<sup>2+</sup> intracelular. Se prepara como solución stock en etanol absoluto, y se conserva a -80°C hasta su utilización. El ionóforo o su solvente se añade en pequeños volúmenes (<0,1%) a las muestras para evitar la alteración de las células.

Romiplostin, análogo del TPO (Romiplostin, Amge Europe, Breda, Holanda), se disuelve con suero fisiológico a la concentración deseada.

#### 3.3.2. Moduladores de la respuesta plaquetaria

La apirasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España), enzima encargada de eliminar ADP y ATP liberado por las plaquetas. Y la prostaciclina (Sigma-Aldrich, Madrid, España), molécula lipídica que aumenta el AMPc e inhibe la función plaquetaria. Son inhibidores utilizados en el lavado de plaquetas para evitar su agregación durante el proceso. Se disuelven en PBS y se guardan a -80°C.

Como inhibidores proteolíticos se emplea el cóctel de inhibidores III (Calbiochem, Lutterworth, RU), el cual contiene 100 mM AEBSF, 80 μM aprotinina, 5 mM bebstatin, 1,5 mM E-64, 2 mM leupeptina y 1 mM pepstatin A, disueltos en DMSO. El stock está a una concentración 100X.

El AAS y el salicilato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se preparan el día del experimento, diluyendo la cantidad apropiada en suero fisiológico.

### 3. Material y Métodos

El 2MeSamp (2 - Methylthioadenosine 5' - monophosphate triethylammonium salt hydrate) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) inhibidor del receptor  $P_2Y_{12}$ , se disuelve con suero fisiológico a la concentración adecuada.

La imipramina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) que impide la recaptación de serotonina, se prepara el día del experimento diluyendo en suero fisiológico a la concentración adecuada.

La indometacina (Sigma-Aldrich, Madrid, España), bloqueante de la COX-1 se prepara diluyéndola en carbonato sódico anhídrido.

El RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), es un bloqueante de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  que impide la agregación plaquetaria. Se disuelve en PBS y se guarda a  $-20^\circ\text{C}$ .

El SQ29,548 (Cayman Chemicals, EEUU) es un bloqueante del receptor del  $\text{TXA}_2$ , se disuelve con DMSO a una concentración stock de 3 mM.

Inhibidores de fosfatasas: “sodium orthovanadate” ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) inhibidor de ATPasas, fosfatasas alcalinas y tirosina fosfatasas, y “sodium fluoride” (NaF) inhibidor de serina/treonina fosfatasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Inhibidores de las HDAC:

El Trichostatin A (TSA) ([R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino)phenyl] - N - hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamida) inhibidor general de las HDAC clásicas (Upstate (Cell signaling solutions, Beverly, EEUU).

El Tubastatin A hidrocloreto (TBA) (N-Hydroxy-4-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrido [4,3-b] indol-5-ylmethyl) benzamidehidrocloreto) inhibidor de la HDAC6 (Calbiochem, RU).

Inhibidores de las sirtuinas:

La nicotinamida (NAM) (Pyridine-3-carboxylic acid amide) inhibidor general de las sirtuinas (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

El cambinol (CAM) (5-(2-Hydroxynaphthalen-1-ylmethyl) - 6-phenyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-pyrimidin-4-one, 5 - [(2-hydroxy-1-naphthyl) methyl] -2-mercapto -6-phenyl-4(3H)-Pyrimidinone) inhibidor general de las sirtuinas (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

El AGK2 (2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furanyl] -N-5-quinolinyl-2-propenamida) inhibidor de la SIRT2 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

El EX527 (6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Carbazole-1-carboxamida) inhibidor de la SIRT1 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Todos los inhibidores de las HDAC clásicas y de las sirtuinas se disuelven en DMSO a la solución stock y se guardan a -20°C hasta el momento del experimento. La concentración de DMSO se mantiene siempre por debajo del 0,1% para evitar interferencias con la función de las plaquetas<sup>104,105</sup>. Las diluciones de trabajo apropiadas se preparan con tampón HBSS 1X (0,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,36 mM KCl, 0,441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 5,55 mM glucosa, 20 mM Hepes, pH 7,4) y se usan en el día.

### 3.3.3. Anticuerpos monoclonales o policlonales

Se han utilizado otros reactivos como son anticuerpos primarios para las distintas inmunodetecciones e inmunoprecipitaciones y anticuerpos para el marcaje de plaquetas por citometría de flujo:

$\alpha$ -tubulina total (Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU) y su forma acetilada, acetil- $\alpha$ -tubulina (Lys<sup>40</sup>), nº de catálogo 5335 (Cell Signaling, Beverly, MA) o acetil- $\alpha$ -tubulina (Lys<sup>40</sup>), nº de catálogo 32-2700 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, España).

AKT (pan) nº de catálogo 4691, AKT fosforilada (Ser<sup>473</sup>), nº de catálogo 4060; AKT fosforilada (Thr<sup>308</sup>) nº de catálogo 2965 (Cell Signaling, Beverly, EEUU).

HDAC6, nº de catálogo 7612S (Cell Signaling, Beverly, EEUU).

Lisinas acetiladas, clone 4G12, conjugado con agarosa, nº de catálogo 16-272; y lisinas acetiladas, nº de catálogo AB3879 (Millipore, Billerica, EEUU); lisinas acetiladas, nº de catálogo 944 y lisinas acetiladas (Ac-K<sup>2</sup>-100), nº de catálogo 9814 (Cell Signaling, Beverly, EEUU).

GSK-3 $\beta$  fosforilada (Ser<sup>9</sup>), nº de catálogo 5558 (Cell Signaling, Beverly, EEUU).

SIRT1, nº de catálogo 2493 (Cell Signaling, Beverly, EEUU).

SIRT2, nº de catálogo 04-1124 (Millipore, Billerica, EEUU).

STAT3 (79d7) nº de catálogo 4904; STAT3 acetilada (Lys<sup>685</sup>) nº de catálogo 2523 y STAT3 fosforilada (Tyr<sup>705</sup>), nº de catálogo 9145 (Cell Signaling, Beverly, MA).

Los anticuerpos secundarios estaban unidos a peroxidasa y eran contra la especie adecuada en cada caso (Amersham Biosciences, EEUU).

Anticuerpo monoclonal contra las células leucocitarias, CD45 conjugado FITC, nº de catálogo: 45F1-100T (Immunostep, Salamanca, España)

#### 3.3.4. Otros reactivos

También se utilizaron kits de ELISA para la detección del tromboxano B<sub>2</sub> (TBX<sub>2</sub>): kit de ELISA Amersham Thromboxane B<sub>2</sub> Biotrak Assay con nº de catálogo RPN220 (GE Healthcare, RU).

La serotonina marcada radiactivamente, (<sup>14</sup>C) – 5 hidroxitriptamina (sulfato de creatinina) (5HT), 54 mCi/mmol (en 2% de etanol) (Amersham Biosciences, RU)

El agente fluorescente FURA-2/AM (fura-2pentakis (acetoxynethyl) ester) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para la determinación del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, se disuelve con DMSO a una concentración de 500 µM y se guarda a -20°C protegido de la luz hasta el momento del experimento.

Luciferin-Luciferasa y ATP Standard (Chrono-log Corporatio, Bio Top Medical, EEUU), se disuelven con agua destilada a una concentración de 2 µM, tanto para la Luciferin-Luciferasa como el ATP Standard, y se guardan a -20°C.

Membranas de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, Alemania), los líquidos de revelar (ECL Chemiluminiscence) y las películas (Amersham Hyperfilm ECL9 (GE Healthcare Life Sciences,

Barcelona, España), y el resto de materiales necesario para realizar el revelado de las inmunodetecciones o inmunoprecipitaciones<sup>36</sup>.

Filtros para la eliminación de los leucocitos de una muestra de plaquetas lavadas (Acrodisc® PSF 25mm Syringe Filter for White Blood Cell Isolation, Pall Corporation, EEUU).

#### **3.4. Extracción de la sangre y separación de las células sanguíneas**

Los experimentos que se describen en este trabajo, como son la separación de las células y su ensayo experimental, siempre se realizan en el mismo día de la extracción. El método de extracción de sangre, separación y lavado de plaquetas empleado es igual para los distintos estudios de agregación o lumino-agregación, liberación de serotonina y técnicas inmunológicas o inmunoprecipitación<sup>106</sup>. Excepto para los estudios de los movimientos de  $Ca^{2+}$  que se detallarán en el apartado correspondiente.

Para la extracción de sangre se utilizó muestras de sangre venosa, procedentes de donantes voluntarios sanos, en ayunas y que no habían tomado ninguna medicación que pudiera afectar a la función plaquetaria, durante al menos los 15 días previos. Se obtiene sangre venosa de la vena cubital mediante el sistema vacutainer de extracción de sangre. Los tubos utilizados fueron de 4,5 mL de anticoagulante citrato sódico 3.2%<sup>40</sup>. Todos los estudios incluidos cuentan con la autorización del comité ético del Hospital Universitari i Politènic La Fe de València. Todas las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado del donante y se manejaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki<sup>107</sup>.

#### 3.4.1. Lavado de las células sanguíneas

La sangre anticoagulada con citrato se centrifuga a 200xg durante 10 minutos a 22°C para separar el plasma rico en plaquetas (PRP) del precipitado de hematíes y leucocitos. El primer paso es acidificar el PRP a pH 6,5. Esto se consigue añadiendo una solución de citrato (38 mM ácido cítrico, 75 mM citrato sódico), 1 mL por cada 10 mL de PRP, además se añade 0,01 U/mL de apirasa y 0,05 mg/mL de prostaciclina para evitar la activación plaquetaria durante el proceso de lavado. Se mezcla suavemente y se centrifuga a 2.000xg (10 min, 22°C). El precipitado plaquetario que se obtiene se resuspende suavemente en un volumen de 10 mL de tampón Tris-Citrato (63 mM Tris, 95 mM NaCl, 5 mM KCl, 12 mM ácido cítrico, 5,5 mM glucosa, pH 6,4), y se añade de nuevo apirasa y prostaciclina. Esta resuspensión se centrifuga a 2.000xg (10 min, 22°C) y se elimina cuidadosamente el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspende en 1-2 mL de tampón HBSS 1X, teniendo especial cuidado en no formar burbujas. Se realiza un conteo de células a partir de una dilución 1/10 con HBSS 1X. El número de células se ajusta a  $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ L con tampón HBSS 1X, y se mantiene sin agitación en hielo durante el experimento.

#### 3.5. Estudios de agregación o lumi-agregación en plaquetas lavadas

Los estudios de agregación o lumi-agregación se realizan siguiendo el método de agregometría óptica descrito por Born en 1962<sup>108</sup>. Las agregaciones se realizan en un volumen de 300  $\mu$ L, que contiene  $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu$ L en tampón HBSS 1X y 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Cuando queremos estudiar el efecto de distintas sustancias sobre la agregación plaquetaria, se suele partir de una dilución stock, y se añade la cantidad adecuada para la concentración requerida. Las muestras se incuban sin agitar (10 min - 1 hora, 37°C) en una cubeta de agregación siliconada que contiene un imán recubierto de teflón. Como control, se utilizan plaquetas que se incuban a los mismos tiempos con el solvente adecuado. Si el solvente es el DMSO, éste siempre estará a una concentración inferior de 0,1%. Para iniciar la agregación se ajusta la transmitancia del aparato con el tampón sin plaquetas, pero con las proporciones adecuadas, de modo que la diferencia en la transmitancia entre las plaquetas lavadas y el tampón sea del 100%. La agregación se realiza con agitación (1.000 r.p.m.) y a 37°C. Al añadir el inductor de la agregación, se inicia un aumento de transmitancia en el detector a medida que las plaquetas se van agregando. La cuantificación de la curva de agregación se realiza por la medida de la intensidad máxima de agregación expresada en %, siendo el 100% el máximo posible de agregación registrable.

Con respecto al estudio de lumi-agregometría, el proceso es igual que el de la agregación, sustituyendo un volumen de tampón por la solución de Luciferin-Luciferasa, e incubando durante 2 minutos para eliminar el posible ATP presente, antes de la estimulación. Para determinar la cantidad de ATP liberado, se utiliza ATP Standard a una concentración conocida de 2  $\mu\text{M}$ , determinando la luminiscencia correspondiente a esa concentración, lo que permite posteriormente emplear el programa Aggro/link8 para calcular la concentración de ATP liberado tras la estimulación. La lumi-agregometría permite realizar a la vez el estudio de agregación plaquetaria y de liberación de gránulos densos.

Para poder estudiar el efecto de distintos inhibidores, las plaquetas se incuban con los diferentes compuestos, a los tiempos indicados en cada caso, previamente a la estimulación. Como control, las plaquetas se incuban con los distintos solventes a las mismas concentraciones.

#### 3.6. Determinaciones bioquímicas

##### 3.6.1. Determinación del TXB<sub>2</sub> por ELISA

La síntesis del TXA<sub>2</sub> por parte de las plaquetas se valoró cuantificando por enzimoimmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Amersham Thromboxane B<sub>2</sub> Biotrak Assay (GE Healthcare, RU)), determinando la concentración del metabolito estable, el TXB<sub>2</sub><sup>21,109-111</sup>. Para medir el TXA<sub>2</sub> se realizaron agregaciones de 500 µL de 2x10<sup>5</sup>plaquetas/µL, de 3 minutos de duración con distintos agonistas o inhibidores plaquetarios. Pasado este tiempo la muestra se transfirió a un tubo Eppendorf frío que contiene indometacina (8 µg/mL), y se centrifuga inmediatamente (1 min a 13.000xg). Se obtiene una alícuota del sobrenadante que se transfiere a un nuevo tubo de Eppendorf. Esta muestra se guarda a -80°C hasta el momento de la realización del ELISA. El frío y la indometacina, sustancia inhibidora de la COX-1, evitan una posible progresión de la reacción.

#### 3.6.2. Determinación de la liberación de gránulos densos por serotonina

Para realizar los estudios de liberación de gránulos densos por serotonina, se requiere de un marcaje de las plaquetas con (<sup>14</sup>C)-5 hidroxitriptamina (sulfato de creatinina) (5HT), 54 mCi/mmol (en 2% de etanol). El reactivo se ajusta a una concentración final de 0,2 nM, y se incuba en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se toman alícuotas de 50 µL de PRP marcado y 50 µL de PPP y se añaden a viales de centelleo líquido (4 mL de Ecoscint A (National Diagnostics, RU)) para el control de la radiactividad incorporada en las plaquetas.

Posteriormente, se lavan las plaquetas según el método descrito más arriba. La agregación (500 µL,  $2 \times 10^5$  plaquetas/µL) se detiene a los 3 minutos, tras la adición del agonista con 125 µL tampón de parada 5X (0,05 M EDTA, 0,633 M formaldehído)<sup>112</sup>, se transfiere a un tubo Eppendorf y se centrifuga (13.000xg, 1 min). Se recoge una alícuota de 200 µL que se separan en dos de 50 µL para poder realizar el conteo de radiactividad por duplicado. Un minuto antes de la estimulación de las plaquetas se añade imipramina (2,5 µM) para evitar la rápida reincorporación de la serotonina liberada durante la activación plaquetaria<sup>40</sup>.

El cálculo del porcentaje de liberación de (<sup>14</sup>C)-5HT, se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente: % liberado = (muestra – control / total fondo) X 100, siendo el control la cantidad de (<sup>14</sup>C)-5HT liberada por la manipulación experimental en ausencia de agonista plaquetario, así se muestra la cantidad de (<sup>14</sup>C)-5HT liberada por el efecto del agonista. El total es la cantidad total de radiactividad contenida en las plaquetas y el fondo es la lectura del líquido de

centelleo en ausencia de muestra. Para obtener el total se parte de una alícuota de plaquetas marcadas en ausencia de centrifugación y lisadas con 50  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 al 2%.

#### 3.7. Estudios de movimientos de $\text{Ca}^{2+}$

Los agentes fluorescentes se caracterizan por sufrir cambios en su fluorescencia al unir distintas moléculas. Estos cambios permiten conocer los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plaquetas. Hay diversas maneras de realizar el estudio como son: la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo o la espectrofotometría de fluorescencia.

En nuestro caso utilizamos la espectrofotometría de fluorescencia, y el indicador fluorescente de elección fue el FURA-2/AM, el cual presenta una constante de disociación ( $K_d$ : 224 nM en presencia de 1 mM de  $\text{Mg}^{+2}$ ) compatible con los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plaquetas<sup>113</sup>. Además, el FURA-2/AM permite el cálculo del cociente de las intensidades de fluorescencia medidas a dos diferentes longitudes de onda, lo que resulta en la cancelación de variaciones artefactuales en la señal de fluorescencia. Este tipo de medidas permite obviar factores como la concentración del indicador, la intensidad de la excitación y la eficiencia de la detección. Además, se eliminan artefactos como el apantallamiento, la liberación del indicador al medio, y la distribución no uniforme del indicador, tanto dentro de la célula (compartimentalización) como entre células<sup>113</sup>.

En nuestro sistema, la muestra se excita alternativamente a 340/380 nm, y se mide la emisión a 510 nm. Excitando a 340 nm, un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca un aumento en la

intensidad de fluorescencia, mientras que, excitando a 380 nm, el mismo incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca una disminución en la intensidad de fluorescencia. El cálculo del cociente entre las dos intensidades nos da una medida de la variación de la fluorescencia libre de artefactos.

El empleo de la forma esterificada del indicador permite que su introducción en el interior de la plaqueta se produzca simplemente por difusión, sin necesidad de utilizar procedimientos que alteren la integridad de la membrana. La forma esterificada no se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , y además, es apolar por lo que puede difundir fácilmente a través de la membrana. Una vez dentro de la célula distintas esterasas actúan sobre el indicador, dando lugar a una forma polar, que no puede salir de la célula con facilidad y reacciona con el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los estudios de movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizan en un tiempo máximo de 2 horas tras la obtención de las plaquetas cargadas con FURA-2/AM, debido a que el FURA-2/AM se hidroliza y se secreta de las plaquetas. Además, la presencia de FURA-2/AM en las plaquetas provoca la acumulación de aldehídos que pueden dañarla.

El PRP obtenido de sangre anticoagulada con citrato se ajusta a  $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  con PPP, se añade 25  $\mu\text{L}$  de 200 mM EGTA y 1  $\mu\text{L}$  de FURA-2/AM por cada mL de PRP (concentraciones finales de 5 mM EGTA y 1,5  $\mu\text{M}$  FURA-2/AM). El PRP con FURA-2/AM se incuba en oscuridad (45 min, 37°C), y se agita ocasionalmente de forma suave. Pasado este tiempo, se procede a lavar las plaquetas como se ha descrito anteriormente (Apartado 3.4.1.) y se empieza con el estudio de los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tras añadir el agente inductor de la agregación a la suspensión de plaquetas ( $75 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ )  $\pm$  1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , se registran las

variaciones en las longitudes de onda de forma continua durante 3 minutos. A continuación lisamos las plaquetas con 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para obtener el valor  $F_{max}$  (máximo fluorescencia). Finalmente, se quela el  $Ca^{2+}$  con 10 mM EGTA para obtener el valor  $F_{min}$  (mínima fluorescencia en ausencia de  $Ca^{2+}$ ). El cálculo de la concentración de  $Ca^{2+}$  se realiza de acuerdo con el descrito por Grynkiewicz *et al*<sup>13</sup>. Se realizan los cálculos a distintos tiempos para construir una gráfica de concentración de  $Ca^{2+}$  frente a tiempo.

#### 3.8. Purificación de ARN, retrotranscripción y PCR

Para la obtención del ARNm de las plaquetas se partió de una mezcla de 10 mL de plaquetas lavadas y leucodepletadas. Para descartar la presencia de leucocitos en la muestra, que pudiera contaminar purificación de ARNm, se utilizó la citometría de flujo y el marcaje de la misma con CD45, el cual se une a los leucocitos. Se estableció que debía de haber un máximo de 1 leucocito por cada 100.000 plaquetas, para considerar que la muestra era adecuada.

El ARN total se extrajo a partir de una muestra de  $5 \times 10^9$  plaquetas/ $\mu$ L, con 1 mL de Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se retrotranscribió como se ha descrito previamente<sup>14</sup>. El ADN complementario diluido se amplificó 35 ciclos en el termociclador LightCycler 480 con el LightCycler DNA Master SYBR Green (Roche Applied Sciences, Barcelona, España). Una alícuota de 15  $\mu$ L de la reacción de PCR fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 2% y posteriormente se tiñó con SYBR Green Safe (Life Technologies, Madrid, España). Para la

detección del ARNm se diseñaron cebadores específicos, utilizando las referencias publicadas en la base de datos RefSeq.

Los cebadores diseñados se expanden al menos un intrón en la secuencia genómica correspondiente, para asegurar que no haya amplificaciones de ADN contaminante. Los cebadores para las SIRT humanas fueron las siguientes: SIRT1: directo, 5'-CTGGAACAGGTTGCGGGAAT-3' y reverso, 5'-TTCATGATAGCAAGCGGTTCA-3'; SIRT2: directo, 5'-CTCTATCCTGGGCAGTTCAA-3' y reverso, 5'-CAGCTTAGCGGGTATTCGTG-3'.

Para demostrar la ausencia de contaminación por células leucocitarias, se amplificó el ADN complementario humano de hígado, como control positivo (el hígado contiene hepatocitos que expresan SIRT1, SIRT2 y células leucocitarias CD45 positivas). Se amplificó por PCR la  $\beta$ -actina durante 25 ciclos como control de normalización.

#### 3.9. Técnicas inmunológicas

Hemos empleado diversas técnicas inmunológicas, todas ellas se caracterizan por el uso de anticuerpos específicos, tanto monoclonales como policlonales. Éstos permiten identificar una proteína determinada fijada sobre una membrana a través de la inmunodetección, o bien aislar una proteína a partir de un lisado celular por inmunoprecipitación.

#### 3.9.1. Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*

El hecho de que se hayan desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de distinguir entre la forma acetilada o no, fosforilada o no, de diferentes aminoácidos, ha permitido utilizar las técnicas de inmunodetección, con la finalidad de estudiar las distintas modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las proteínas<sup>40,115</sup>.

La detección de proteínas en las plaquetas se realizó por inmunodetección<sup>116</sup>. Tras activar las plaquetas lavadas (300  $\mu$ L, con  $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu$ L) con el agonista apropiado (o los inhibidores indicados), la agregación se detiene con 75  $\mu$ L de tampón RIPA 5X (50 mM Tris pH 7,4, 0,1% SDS, 15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% deoxycholic acid, 1 mM EGTA, 0,5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 500 nM TSA, 10 mM NAM e inhibidores proteolíticos 5X). Las muestras se conservan a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de usarlas. El día del experimento se descongelan y se diluyen 1:1 (v/v) con tampón de muestras 2X (62,5 mM Tris, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol, pH 6,8) y se hierven 5 minutos a  $95^\circ\text{C}$  y se centrifugan a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 seg. Las muestras así preparadas se cargan (10-30  $\mu$ L) en geles de 7,5% de acrilamida (150x130x1mm), con un *stacking* del 3,9% de acrilamida, y se corre la electroforesis (130 Voltios,  $\pm$  12 horas), hasta que el frente alcance el final del gel. También se utilizó el sistema de minigeles de Invitrogen, con un tamaño de 80x180x1mm, que permite realizar una electroforesis más rápida, a costa de perder resolución, por lo que estos últimos se usaron en los casos en los que se quiere detectar una única proteína. El gel y la membrana de nitrocelulosa se incuban 10 minutos en agitación en el tampón de transferencia (25 mM Tris, 193 mM Glicina, 20% Metanol) y seguidamente se monta el sándwich de



transferencia, utilizando membranas de nitrocelulosa, según las instrucciones del fabricante en nuestro caso Invitrogen. En este trabajo se ha usado tanto transferencia sumergida como semi-seca.

Una vez concluida la transferencia, la membrana se lava con agua destilada y se tiñe con Ponceau S (0,5% (p/v) en 1% de ácido acético)<sup>39</sup>. Esta tinción nos permite comprobar tanto la eficiencia de la transferencia, como la cantidad de muestra que hemos cargado en cada pocillo. El siguiente paso es bloquear los sitios de unión inespecíficos de la membrana. Para ello, se incuba durante 1 hora en tampón de bloqueo ((TBST 1X (10 mM Tris, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween) + 5% leche en polvo desnatada o BSA, a pH 7,5), y se lava (3x5 min) en TBST 1X. El anticuerpo primario se diluye a la concentración adecuada de cada anticuerpo con tampón de bloqueo, y se incuba toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con TBST 1X, se incuba durante 1 hora con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y diluido a la concentración adecuada con tampón de bloqueo, y se vuelve a lavar con TBST 1X. El revelado se realiza mediante quimioluminiscencia con el kit ECL Western Blot según las instrucciones del fabricante. Brevemente, la membrana se incuba 1 minuto con la mezcla de los reactivos, y tras eliminar el líquido sobrante se cubre con un plástico transparente, y se coloca sobre una película (Hyperfilm ECL) o directamente en el sistema de análisis de imagen. Realizamos una primera exposición de 1 minuto, que se revela inmediatamente, y dependiendo de la intensidad, se realizan otras exposiciones de más o menos tiempo. Normalmente se realizan 3 exposiciones de 1, 5 y 15 minutos.

Una posible manera de confirmar que el proceso se ha realizado de manera adecuada es utilizar un control de carga, en

nuestro caso utilizamos a la proteína  $\alpha$ -tubulina o STAT3. La banda de señal correspondiente a la  $\alpha$ -tubulina o STAT3 de cada una de las muestras, debe ser la misma, ya que partimos del mismo número de plaquetas en cada una de las muestras que se estudian.

#### 3.9.2. Inmunoprecipitación de proteínas

La inmunoprecipitación de proteínas se realizó a partir de agregaciones de plaquetas lavadas de 400  $\mu$ L con  $4 \times 10^8$  plaquetas/ $\mu$ L. A los tiempos deseados se detuvo la agregación con el tampón RIPA 5X y se deja en hielo durante 1 hora. El lisado se centrifuga a 10.000xg (10 min, 4°C) para eliminar material no disuelto. El sobrenadante puede guardarse a -80°C hasta el momento de la inmunoprecipitación.

En primer lugar, se incuban las muestras durante toda la noche con el anticuerpo contra la proteína deseada unida a agarosa. Después de un lavado extensivo (5 lavados con TBST 1X centrifugando brevemente cada vez y eliminando cuidadosamente el sobrenadante), las perlas de agarosa se resuspendieron en tampón de muestra y se hirvieron. Las proteínas se separaron en geles de acrilamida como hemos visto anteriormente. Se revela primero con el mismo anticuerpo con el que se ha inmunoprecipitado para comprobar si hay la misma cantidad de muestra en todas las bandas. Tras eliminar los anticuerpos, incubando la membrana durante 30 minutos a 50°C con tampón de lavado (70 mM SDS; 63 mM Tris; 0,7%  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7,4), se reincuba la membrana para inmunodetectar la acetilación de la proteína de interés.

#### 3.10. Aislamiento del citoesqueleto

El método de aislamiento utilizado se basa en la insolubilidad de los polímeros de actina en Triton X-100. De esta forma, al lisar las plaquetas con este detergente, se pueden extraer los polímeros de actina por centrifugación, así como las proteínas asociadas<sup>117</sup>.

Tras estimular las plaquetas lavadas (300  $\mu\text{L}$  de  $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) con el agonista plaquetario que se esté empleando (ej. colágeno), se para la reacción con 300  $\mu\text{L}$  de tampón 2X de Triton X-100 (1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 500 nM TSA, 50 mM Tris-HCl, 10 mM NAM e inhibidores proteolíticos 5X (protease inhibitor cocktail III), pH 7,4) y se deja en baño de hielo durante 1 hora, tras la cual se centrifuga a 15.600xg (4 min, a 4°C). El sobrenadante se retira cuidadosamente y el precipitado se lava 3 veces con el mismo tampón de Triton X-100, pero 1X. El precipitado finalmente se resuspende en 200  $\mu\text{L}$  de tampón de muestras 2X y se hierve 5 minutos, a 95°C y se centrifuga 30 seg. a 4°C. Las muestras así obtenidas se corren en geles de acrilamida del 7,5 %, los cuales se tiñen con azul de Coomassie, o se transfieren a membranas para permitir la detección específica de determinadas proteínas.

#### 3.11. Citometría de flujo

Se emplean 10  $\mu\text{L}$  de plaquetas lavadas ( $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) en 100  $\mu\text{L}$  de tampón HBSS 1X con 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , con concentraciones saturantes de los anticuerpos. En esta ocasión se utilizó un anticuerpo contra los leucocitos (CD45) para confirmar que las plaquetas lavadas se encontraban leucodepletadas, después de pasar por los filtros de eliminación de leucocitos. Se dejan 30 minutos en oscuridad sin agitar

y finalmente, se diluyen con 2 mL de tampón HBSS 1X. La medida por citometría de flujo se realiza en el mismo día del ensayo. Para cuantificar el porcentaje de leucocitos presentes en la muestra de plaquetas lavadas se cuentan 10.000 plaquetas identificadas por el tamaño y la forma, y se cuantifica la cantidad de CD45 presente en la muestra.

#### **3.12. Microscopía confocal**

Para realizar la microscopia confocal se partió de plaquetas lavadas que posteriormente fueron fijadas con 1% de formaldehído durante 30 minutos. El siguiente paso fue realizar diversos lavados con tampón PBS con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl y 0,3% de BSA.

Para que el anticuerpo primario pueda penetrar en el interior de la célula, se requiere que estas sean permeabilizadas. Para ello, las plaquetas se permeabilizaron con un 0,1% de saponina en PBS, una vez permeabilizadas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-BSA, y se añadió anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Se incubó durante 1 hora y se realizaron de nuevo tres lavados con el mismo tampón. Finalmente, se montó con un cubreobjetos para poder visualizarlo por el microscopio confocal Leica TCS con un objetivo de 60X.

#### **3.13. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se

### 3. Material y Métodos

llevó a cabo mediante el test ANOVA. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado significativo. En el caso de las imágenes presentadas, éstas son representativas en todos los casos de al menos 5 experimentos diferentes.



## 4. RESULTADOS

## 4. Resultados



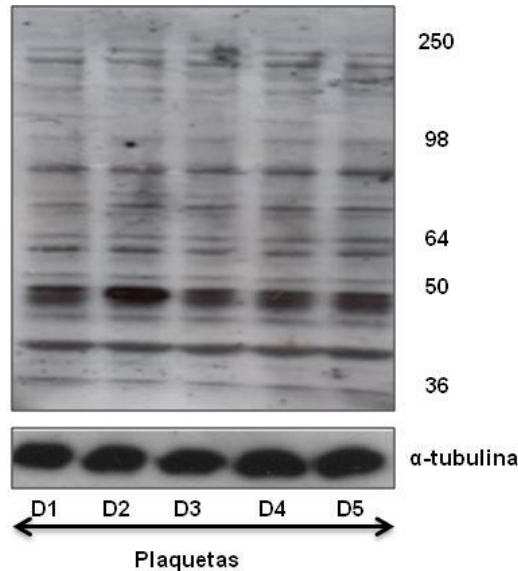
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Patrón de proteínas acetiladas en Lys en plaquetas humanas

La acetilación de proteínas no histonas es una modificación postraduccional capaz de regular la función de proteínas implicadas en distintos procesos celulares<sup>68</sup>. No se ha explorado la presencia de proteínas acetiladas en Lys en plaquetas humanas, ni sus posibles implicaciones funcionales. Por ello, el primer objetivo de esta Tesis era comprobar si en las plaquetas humanas en reposo existen proteínas acetiladas en Lys.

Decidimos abordar este primer objetivo mediante la técnica de inmunodetección y el empleo de anticuerpos específicos contra proteínas acetiladas en Lys. Para el estudio se utilizaron plaquetas humanas lavadas procedentes de sujetos sanos sin ninguna medicación. Como se muestra en la Figura 4.1, encontramos que en plaquetas en reposo aparecen múltiples proteínas acetiladas en Lys, tanto pequeñas como de grandes pesos moleculares. Algunas de estas proteínas aparecen intensamente acetiladas (o bien se trata de proteínas muy abundantes), mientras que en otros casos la intensidad de la señal era menor. Sin embargo, con la técnica empleada, no podemos diferenciar si se trata de proteínas poco abundantes, y por lo tanto de difícil detección, o de proteínas abundantes pero escasamente acetiladas. Es interesante observar que el patrón de proteínas acetiladas no es exactamente igual en todos los sujetos analizados. Por ejemplo, se observa en la muestra D2 una banda intensamente acetilada de alrededor de 50 kDa, mucho más acetilada que en el resto de las muestras. Por su parte,

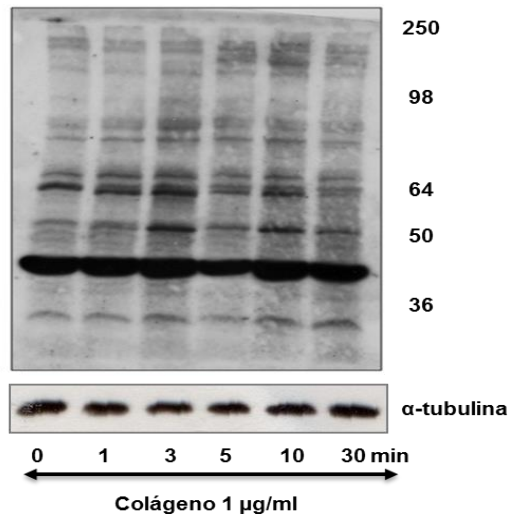
en el resto de las proteínas, se observan diferencias más sutiles pero llamativas. Estos experimentos se repitieron con un grupo más amplio de testigos, y los resultados parecen sugerir que existen variaciones en el patrón de proteínas acetiladas, aunque son necesarios más estudios para confirmar este punto.



**Figura 4.1. Las plaquetas humanas en reposo poseen un patrón de proteínas acetiladas en Lys.** Las plaquetas se incubaron (10 min, 37°C) y se lisaron a los 10 min y, a continuación, se detectaron las proteínas acetiladas en Lys. Se observó un patrón de proteínas acetiladas característico muy similar en cada uno de los individuos, aunque no exactamente igual. En todos los casos el número de plaquetas se ajustó a  $2 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu$ L. A la derecha de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa) de algunas proteínas identificadas. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes y las muestras proceden de 5 donantes diferentes (D1, D2, D3, D4 y D5). En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Dado que existe un patrón de proteínas acetiladas en Lys en plaquetas humanas y en reposo, quisimos investigar si éste se alteraba con la agregación plaquetaria. Para ello empleamos un agonista fisiológico como es el colágeno (1  $\mu$ g/mL). En concreto se

realizó un estudio cinético de agregación plaquetaria (0, 1, 3, 5, 10, 30 min). Pasados los tiempos, se detuvo la agregación, lisando las plaquetas con tampón RIPA. El resultado fue que el estado de acetilación de algunas proteínas varía con la cinética de agregación plaquetaria (Figura 4.2). A los diferentes minutos de agregación, aparecen bandas que aumentan su nivel de acetilación con respecto al control; en cambio hay algunas que se deacetilan. Encontramos también una serie de proteínas que no cambiaban su nivel de acetilación con la agregación plaquetaria.

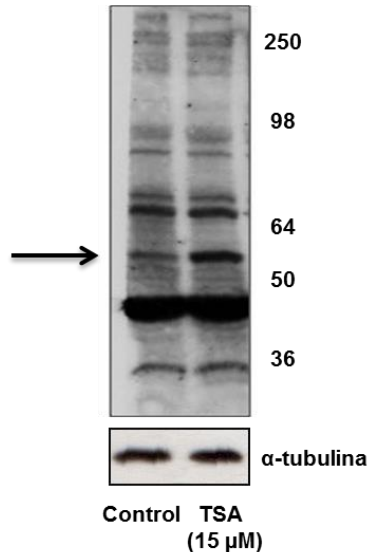


**Figura 4.2. El patrón de proteínas plaquetarias acetiladas en Lys se altera con la agregación plaquetaria.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) y se estimularon con colágeno (1 µg/mL). Las plaquetas se lisan a los tiempos indicados y, posteriormente, se detectaron las proteínas acetiladas en Lys. La agregación plaquetaria provoca cambios en el patrón de proteínas acetiladas de las plaquetas. A la derecha de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa). La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de α-tubulina como control de carga.

#### 4.2. Las HDAC regulan el nivel de acetilación de algunas proteínas en las plaquetas humanas

El nivel de acetilación de las proteínas está determinado por el equilibrio entre las HAT y las HDAC<sup>70,80</sup>. La mayoría de los estudios se ha centrado en conocer el papel de las HDAC y HAT en la regulación de la expresión génica, a través de la acetilación de los residuos amino de las Lys de las histonas<sup>64</sup>. Actualmente, se conocen muchas proteínas no histonas, que también se pueden acetilar y, de esta manera, regular su función, como por ejemplo la inmensa mayoría de enzimas que participan en el metabolismo intermedio<sup>78</sup>, ampliándose el campo de estudio. De hecho, a nivel farmacológico, ya se están desarrollando distintos inhibidores de deacetilasas como tratamiento contra el cáncer<sup>118,119</sup>.

El siguiente paso que nos planteamos, fue estudiar qué ocurría con la acetilación de las proteínas plaquetarias, al tratar las plaquetas con un inhibidor general de las HDAC clásicas, como es el TSA<sup>85</sup>. Para comprobarlo, se utilizaron plaquetas lavadas y se incubaron durante 1 hora a 37°C con TSA (15 µM) o su solvente (control). En la Figura 4.3 se observa un aumento claro del nivel de acetilación de una proteína de aproximadamente 50 kDa en las plaquetas incubadas con TSA, con respecto al control. En cambio, en el resto del patrón de proteínas acetiladas, no se apreciaron cambios significativos.

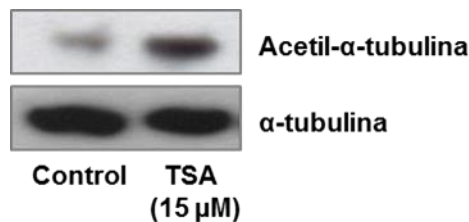


**Figura 4.3. El efecto del TSA en la acetilación de las Lys de proteínas de plaquetas humanas.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con el solvente (control) o con TSA (15  $\mu$ M). A la hora las plaquetas se lisaron, y tras separar las proteínas por electroforesis, se detectaron las proteínas acetiladas en Lys por *western blot*. La flecha indica una proteína que está fuertemente acetilada en respuesta al TSA con respecto al control, con un tamaño molecular aproximado de 50 kDa. A la derecha de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa). La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Con un tamaño aproximado de 50 kDa, se encuentra la  $\alpha$ -tubulina, proteína con capacidad de sufrir diferentes modificaciones postraduccionales, como puede ser la tirosinación y/o la acetilación<sup>120</sup>. En diferentes tipos celulares se conoce que la estabilización de los microtúbulos formados por  $\alpha$ -tubulina depende de la acetilación de la Lys<sup>40 121,122</sup>, de tal forma que cuando la  $\alpha$ -tubulina se encuentra acetilada se impide la polimerización y crecimiento de los microtúbulos<sup>120</sup>. Además, se ha descrito en otros tipos celulares que la  $\alpha$ -tubulina es sustrato de HDAC y se acetila en presencia de su inhibidor, el TSA<sup>122</sup>. Pero, ¿ocurre lo mismo en las plaquetas? Decidimos comprobar si la proteína de unos 50 kDa

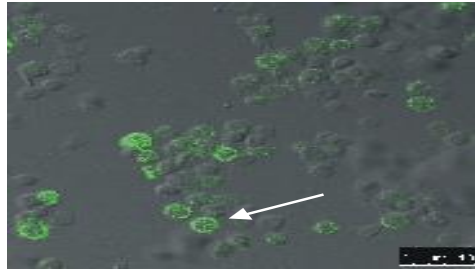
detectada anteriormente (Figura 4.3) era la  $\alpha$ -tubulina en su forma acetilada.

Para ello, se utilizaron los mismos lisados celulares que en el apartado anterior, pero esta vez se utilizó un anticuerpo específico para la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. El resultado que se obtuvo fue que en plaquetas en reposo (control) la  $\alpha$ -tubulina se encuentra parcialmente acetilada, y con el tratamiento con TSA se producía un incremento considerable de su nivel de acetilación (Figura 4.4), sin que se detectaran variaciones en la cantidad total de  $\alpha$ -tubulina.



**Figura 4.4. La acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en plaquetas humanas en reposo e incubadas con TSA.** Las plaquetas se incubaron (1 hora, a 37°C) con el tampón (Control) o con TSA (15  $\mu$ M). Continuación, se lisaron las plaquetas y se inmunodetectó la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. El TSA produce un aumento del nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina con respecto al control. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Por otra parte, y para poder confirmar el resultado obtenido por la inmunodetección, se utilizó la microscopia confocal. Confirmamos que la  $\alpha$ -tubulina se encuentra acetilada en plaquetas en reposo (Figura 4.5). Ésta forma un anillo situado en el interior de la membrana extracelular, coincidiendo con resultados descritos previamente<sup>24</sup>.



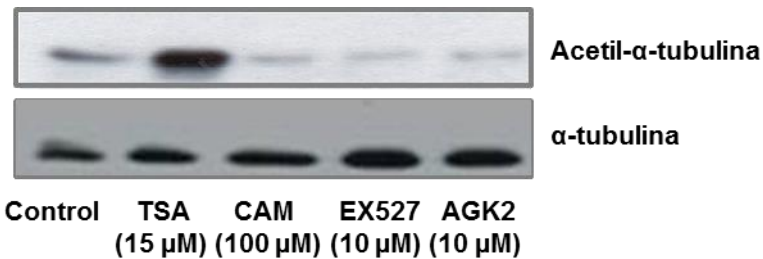
**Figura 4.5. Microscopia confocal de la  $\alpha$ -tubulina acetilada en plaquetas en reposo.** Las plaquetas lavadas fueron fijadas y inmunodetectadas con el anticuerpo para la  $\alpha$ -tubulina en su forma acetilada. El anticuerpo secundario estaba unido a Alexa Fluor 488 y se visualizó con un microscopio confocal Leica, con un aumento del 60X. Los anillos de la  $\alpha$ -tubulina acetilada de plaquetas en reposo están indicados por una flecha. La imagen es representativa de 3 experimentos diferentes.

### 4.3. Especificidad de la regulación de la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina por las distintas HDAC

Por los resultados anteriores podemos decir que en las plaquetas en reposo la  $\alpha$ -tubulina se encuentra parcialmente acetilada, y que su nivel de acetilación aumenta con el tratamiento con TSA (Figura 4.4). En otras células, la  $\alpha$ -tubulina es sustrato tanto de las HDAC clásicas, como de las sirtuinas; en concreto puede ser diana de la HDAC6 o de la SIRT2<sup>123,124</sup>. Nos planteamos investigar qué deacetilasa o deacetilasas eran las responsables de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas humanas.

Decidimos utilizar tanto inhibidores de las HDAC clásicas, como el TSA (inhibidor general de la HDAC), como inhibidores de las sirtuinas, el CAM (inhibidor general de las Sirtuinas), el EX527 (inhibidor de la SIRT1) y el AGK2 (inhibidor de la SIRT2)<sup>86,122</sup>. Partimos de plaquetas lavadas y en reposo, y se incubaron durante 1 hora a 37°C con los distintos inhibidores: 15  $\mu$ M de TSA, 100  $\mu$ M de

CAM, 10  $\mu\text{M}$  de EX527 y 10  $\mu\text{M}$  de AGK2 o con su solvente, el tampón HBSS 1X (control). Las concentraciones elegidas son las habituales en la literatura<sup>122,125</sup>. En la Figura 4.6 se puede observar que sólo el TSA es capaz de provocar un aumento significativo del nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina con respecto al Control. En contraste, la inhibición de la sirtuinas, tanto la general como la de los inhibidores específicos, no indujo ninguna alteración significativa. Sin embargo, como veremos más adelante, las sirtuinas sí están presentes en las plaquetas y juegan un papel importante en el control de las respuestas plaquetarias, lo que sugiere una especificidad en el control de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas distinto al de otros tipos celulares.



**Figura 4.6. Variación en la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina por la inhibición de las HDAC y las sirtuinas.** Las plaquetas lavadas se incubaron (1 hora, a 37°C) con tampón (control), TSA (15  $\mu\text{M}$ ), CAM (100  $\mu\text{M}$ ), EX527 (10  $\mu\text{M}$ ), AGK2 (10  $\mu\text{M}$ ). A continuación, se lisaron las plaquetas y se inmunodetectó la  $\alpha$ -tubulina en su forma acetilada. Sólo el TSA produjo un aumento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas con respecto al control, el resto era similares. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

#### 4.4. La HDAC6 está presente en las plaquetas humanas y se incorpora en el citoesqueleto de las plaquetas activadas

De acuerdo con los resultados previos, las enzimas responsables de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina, son principalmente



las HDAC clásicas. En otros tipos celulares se ha observado que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina es específica de la HDAC6<sup>123</sup>, por lo tanto, es posible que en las plaquetas humanas ocurra lo mismo. Para evaluar si HDAC6 se encuentra presente en plaquetas humanas, partimos de varios lisados plaquetarios procedentes de 3 donantes sanos y una muestra de hepatocitos. Empleamos hepatocitos como control positivo ya que previamente se ha descrito la presencia de la HDAC6 en estas células<sup>123</sup>. Con la ayuda de un anticuerpo específico pudimos observar la presencia de la HDAC6 en plaquetas (Figura 4.7), aunque con un nivel de expresión reducido frente a hepatocitos.

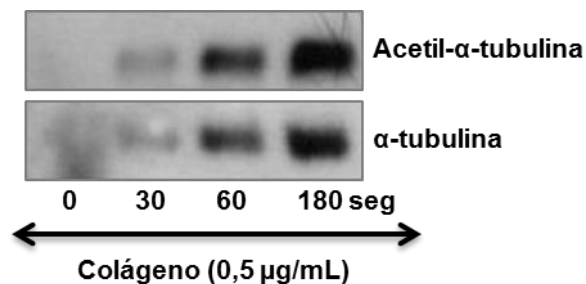


**Figura 4.7. La HDAC6 está presente en plaquetas humanas.** Plaquetas lavadas ( $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ L) procedentes de 3 donantes distintos (D1 - D3), fueron lisadas con tampón RIPA y inmunodetectadas con un anticuerpo anti-HDAC6. Una muestra de hepatocitos lisado ( $1 \times 10^6$  células/mL) fue corrida en paralelo como muestra control. En todos los donantes la HDAC6 está presente. Las muestras proceden de 3 individuos diferentes.

Un proceso importante que regula los mecanismos de activación de las plaquetas es la reorganización de las proteínas estructurales que forman parte del citoesqueleto<sup>39</sup>. En este proceso, se translocan moléculas desde el citoplasma al citoesqueleto de forma selectiva para formar complejos de señalización<sup>126</sup>. Dada la importancia de este proceso en la función plaquetaria, nos planteamos comprobar si la  $\alpha$ -tubulina acetilada y la HDAC6 podrían

estar entre las proteínas que se trasladan al citoesqueleto cuando las plaquetas se activan.

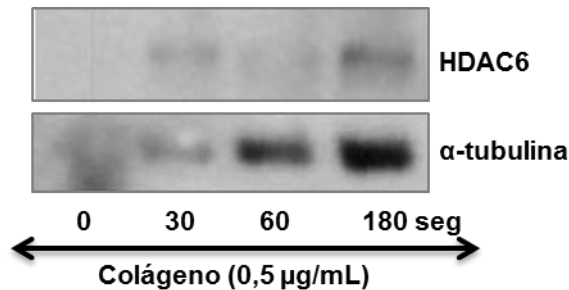
Nuestro estudio comenzó con una cinética de incorporación de proteínas al citoesqueleto. Se estimuló con colágeno 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a diferentes tiempos (0, 30, 60, 180 seg) y se detuvo la agregación plaquetaria añadiendo tampón de lisado Triton X-100 para aislar el citoesqueleto. El siguiente paso fue inmunodetectar tanto la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina como la total. El resultado obtenido lo podemos observar en la Figura 4.8, donde tanto la  $\alpha$ -tubulina como su forma acetilada están ausentes del citoesqueleto en plaquetas en reposo. Sin embargo, a los 30 seg después de la activación, la  $\alpha$ -tubulina acetilada empieza a estar presente en el citoesqueleto reorganizado, aumentando su incorporación a medida que las plaquetas se van agregando.



**Figura 4.8. La  $\alpha$ -tubulina acetilada se incorpora al citoesqueleto.** Para el estudio de la cinética de incorporación de la  $\alpha$ -tubulina acetilada, se lavaron las plaquetas y se estimularon con colágeno (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A diferentes tiempos (0 -180 seg) después de la estimulación, las plaquetas se lisaron con tampón de Triton X-100. La presencia de  $\alpha$ -tubulina total y su forma acetilada se determinó por inmunodetección. La forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina se incorpora rápidamente al citoesqueleto cuando las plaquetas se activan. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes.

Se realizó el mismo experimento para evaluar si la HDAC6 también se incorporaba al citoesqueleto. Se utilizaron las mismas

membranas y se reincubaron con anti-HDAC6. El resultado indicó que la HDAC6 está ausente en el citoesqueleto de plaquetas en reposo, pero que ésta se incorpora rápidamente (30 seg) al citoesqueleto reorganizado (Figura 4.9).



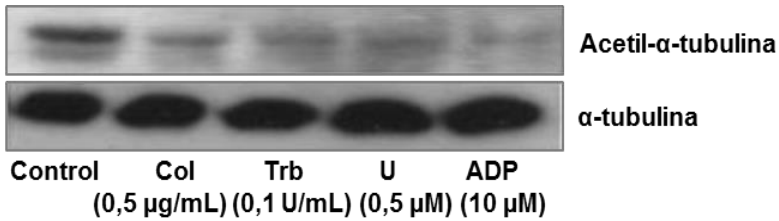
**Figura 4.9. La HDAC6 se incorpora al citoesqueleto.** Las membranas del experimento anterior fueron lavadas y se reincubaron con el anticuerpo contra la HDAC6. En las plaquetas en reposo, la HDAC6 está ausente en el citoesqueleto pero se incorpora rápidamente después de la activación plaquetaria. Esta incorporación se produce en paralelo a la  $\alpha$ -tubulina. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes.

#### 4.5. La agregación de las plaquetas induce la deacetilación de la $\alpha$ -tubulina

Llegados a este punto y con los resultados obtenidos, nos surgieron ciertas preguntas: ¿qué ocurre con la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina cuando las plaquetas son estimuladas con distintos agonistas fisiológicos? ¿participa la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en la función plaquetaria?

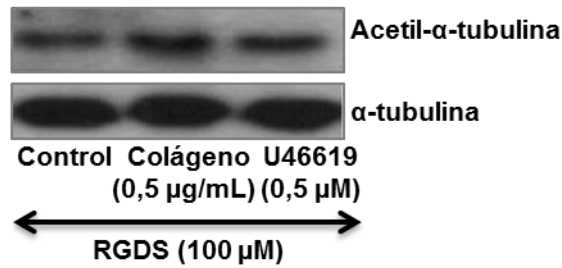
Para resolver estas dudas nos planteamos diversos experimentos. El primero de ellos fue estimular plaquetas lavadas con un panel de agonistas: 0,5  $\mu$ g/mL de colágeno (Col); 0,1 U/mL de trombina (Tr); 0,5  $\mu$ M de U46619 (U) (análogo estable del  $\text{TXA}_2$ ) y 10  $\mu$ M de ADP (ADP) y el solvente (control). Las plaquetas se agregaron

en agitación durante 3 minutos, antes de ser lisadas con tampón RIPA e inmunodetectar la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. En la Figura 4.10 se puede observar que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina disminuye de manera considerable, al agregar las plaquetas con cualquiera de los agonistas empleados.



**Figura 4.10. La agregación de las plaquetas induce la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con el tampón (control) y se estimulan con colágeno (Col 0,5  $\mu$ g/mL), trombina (Trb 0,1 U/mL), U46619 (U 0,5  $\mu$ M) y ADP (10  $\mu$ M). A los 3 min se lisaron las plaquetas y se detectó la  $\alpha$ -tubulina acetilada. La agregación plaquetaria disminuye la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina con respecto del control, para cada uno de los distintos agonistas. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

A la vista de los resultados anteriores, nos planteamos si la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina era debida al efecto directo de los agonistas, o a un proceso común a todos ellos, como es la agregación mediada por la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Decidimos realizar un experimento similar al del apartado anterior pero en presencia de RGDS, cuya función es bloquear a la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , e impedir la agregación plaquetaria<sup>127</sup>. En la Figura 4.11 se observa que el bloqueo de la agregación impide la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina inducida por todos los agonistas. Estos resultados sugieren que la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina está relacionada con los mecanismos de señalización de “fuera-dentro” de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .



**Figura 4.11. El bloqueo de la agregación de las plaquetas impide la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con el solvente (control) más RGDS (100  $\mu$ M) y se estimulan con colágeno (0,5  $\mu$ g/mL) o con U46619 (0,5  $\mu$ M). A los 3 min se lisaron las plaquetas y se detectó la  $\alpha$ -tubulina acetilada por inmunodetección. El bloqueo de la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  impide la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina cuando se induce la agregación plaquetaria, manteniéndose el nivel de acetilación igual al del control. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

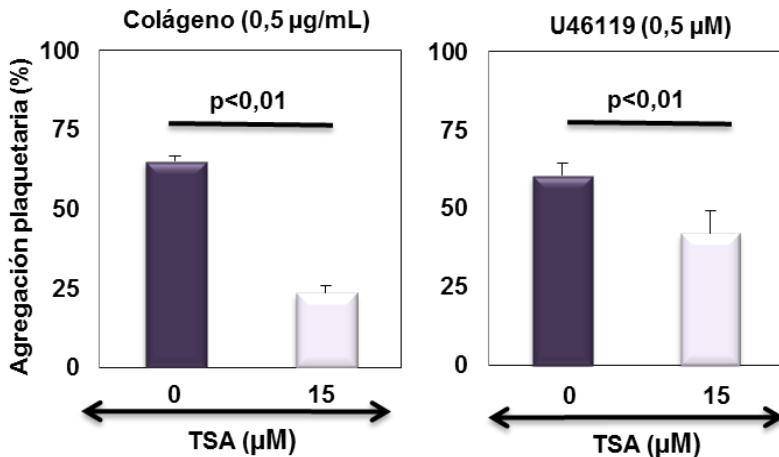
#### 4.6. La regulación de la función de las plaquetas por las HDAC

##### 4.6.1. Agregación plaquetaria y liberación de gránulos densos

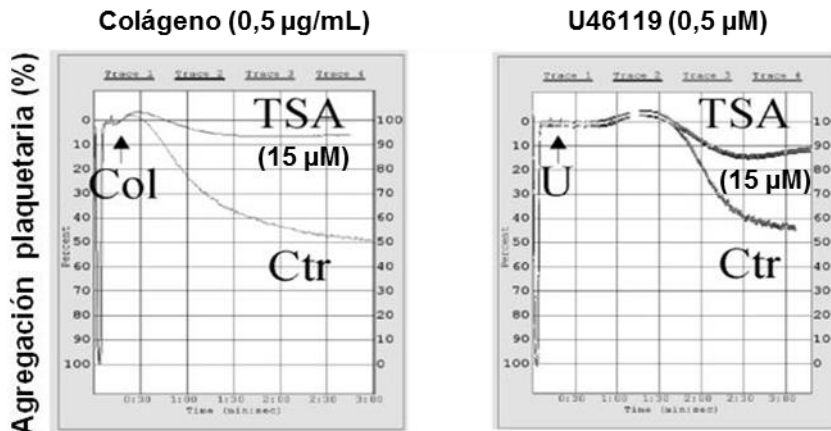
Previamente (Figura 4.7) hemos demostrado la presencia de la HDAC6 en las plaquetas y, además, hemos visto que ésta es, al menos en parte, la enzima responsable de la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina. El siguiente paso fue evaluar si este proceso era relevante en la fisiología plaquetaria. Es decir, determinar si las HDCA clásicas están implicadas en la agregación plaquetaria, la liberación de los gránulos densos y otros procesos importantes en la función plaquetaria.

Por ello, decidimos realizar un primer experimento que consistió en incubar a las plaquetas lavadas sin y con el TSA (15  $\mu$ M), previamente a la estimulación plaquetaria. Antes de realizar el experimento se comprobó que la incubación con el TSA no

provocaba agregación plaquetaria ni cambio de forma (el resultado no se muestra). Después de una hora de incubación, se estimuló con 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colágeno, o con 0,5  $\mu\text{M}$  de U46619, durante 3 minutos. En la Figura 4.12 se puede observar que, en cuanto a la agregación plaquetaria, la mayor inhibición se consiguió en las muestras preincubadas con TSA y que se estimularon con el colágeno. En cambio con el U46619 la inhibición fue menor, aunque significativa. En la Figura 4.13 se muestra un ejemplo representativo del efecto del TSA sobre la agregación plaquetaria estimulada con colágeno o U46619.



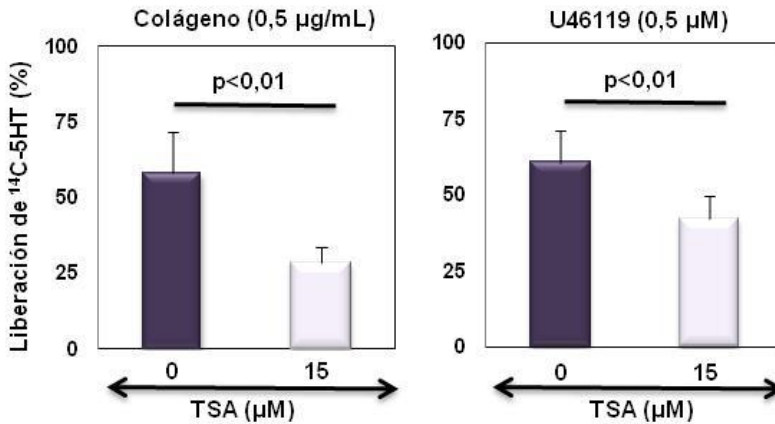
**Figura 4.12. El efecto del TSA sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno y U46619.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) sin y con TSA (15  $\mu\text{M}$ ) y se estimularon durante 3 min y se evaluó el porcentaje de agregación máxima. El TSA provoca una inhibición significativa de la agregación cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno y U46619. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.



**Figura 4.13. La incubación con TSA reduce la agregación plaquetaria al estimular con diferentes agonistas.** La agregación de las plaquetas se inhibió de manera significativa en las muestras preincubadas con TSA (15 µM), respecto al control (Ctr). La imagen es representativa de 10 experimentos diferentes. (Col: colágeno; U: U46619).

A continuación, se estudió el efecto del TSA sobre la liberación de gránulos densos. Se repitió el mismo experimento que en la agregación plaquetaria, pero en este caso las plaquetas fueron previamente marcadas con  $^{14}\text{C}$ -5HT.

En la Figura 4.15 se observa que en aquellas plaquetas que habían sido previamente incubadas con el TSA (15 µM), se redujo de forma significativa la liberación de los gránulos densos mediada tanto por la estimulación con colágeno (0,5 µg/mL) como con U46619 (0,5 µM).

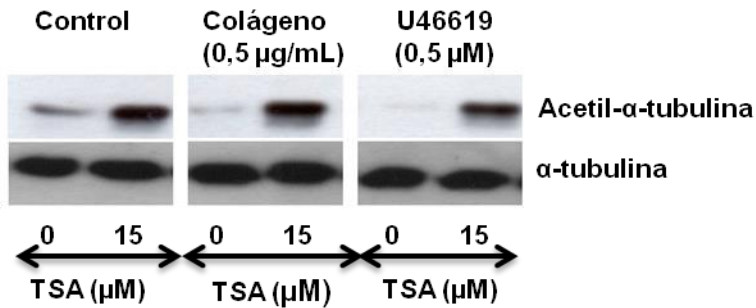


**Figura 4.15. El efecto del TSA sobre la liberación de gránulos densos.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con y sin el TSA (15 µM), y se estimularon con colágeno (0,5 µg/mL) o con U46619 (0,5 µM). Se registró la agregación durante 3 min y se evaluó la liberación de serotonina. El TSA provoca una inhibición significativa de la liberación cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno y U46619. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

Pero, ¿qué ocurre con el nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina cuando las plaquetas son tratadas con el TSA y estimuladas con diferentes agonistas plaquetarios?

Repetimos la agregación plaquetaria, pero en esta ocasión después de estimular las plaquetas con colágeno o U46619 en presencia de TSA se lisaron las plaquetas y se realizó el *western blot*. Los resultados muestran (Figura 4.16) que la inhibición de la HDAC con el TSA impidió la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina inducida por los agonistas (Figura 4.10). Al contrario, el tratamiento con TSA produjo un fuerte incremento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina, como habíamos visto anteriormente (Figura 4.4).

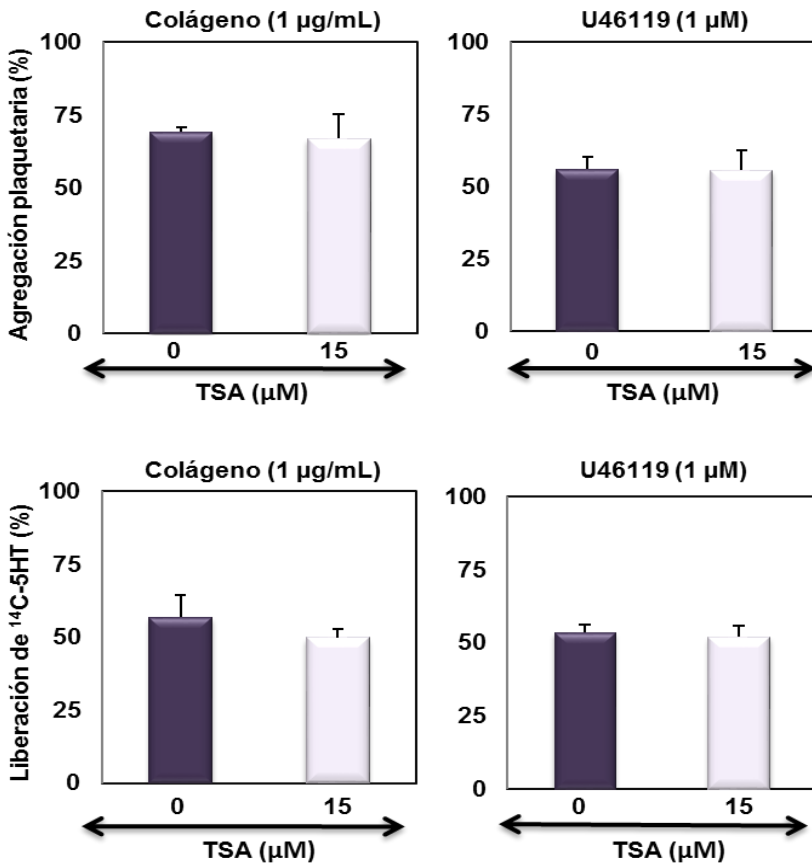




**Figura 4.16. El efecto del TSA en la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en plaquetas estimuladas con agonistas plaquetarios.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con y sin el TSA (15  $\mu$ M), y se estimularon con colágeno (0,5  $\mu$ g/mL) o con U46619 (0,5  $\mu$ M). A los 3 min se lisaron las plaquetas y se detectó la  $\alpha$ -tubulina acetilada por inmunodetección. Los agonistas provocan una disminución del nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina respecto al control, lo que no se producía en presencia de TSA. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Dado que a estas dosis de agonistas conseguíamos una inhibición significativa de la función plaquetaria, decidimos doblar la dosis del estímulo y ver si los resultados se mantenían.

Después de la incubación con el TSA, se estimuló con 1  $\mu$ g/mL de colágeno, o con 1  $\mu$ M de U46619, durante 3 minutos. En la Figura 4.17 se observa que aunque se produce una cierta inhibición con el TSA tanto en la agregación plaquetaria como en la liberación de gránulos densos, ésta no es significativa.



**Figura 4.17.** El efecto del TSA sobre la agregación plaquetaria y la liberación de gránulos densos inducida por colágeno y U46619. Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con y sin TSA (15 µM) y se estimularon con colágeno (1 µg/mL) o con U46619 (1 µM). Se registró la agregación y se evaluó el porcentaje de agregación máxima. El TSA no provoca una inhibición significativa de la agregación. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

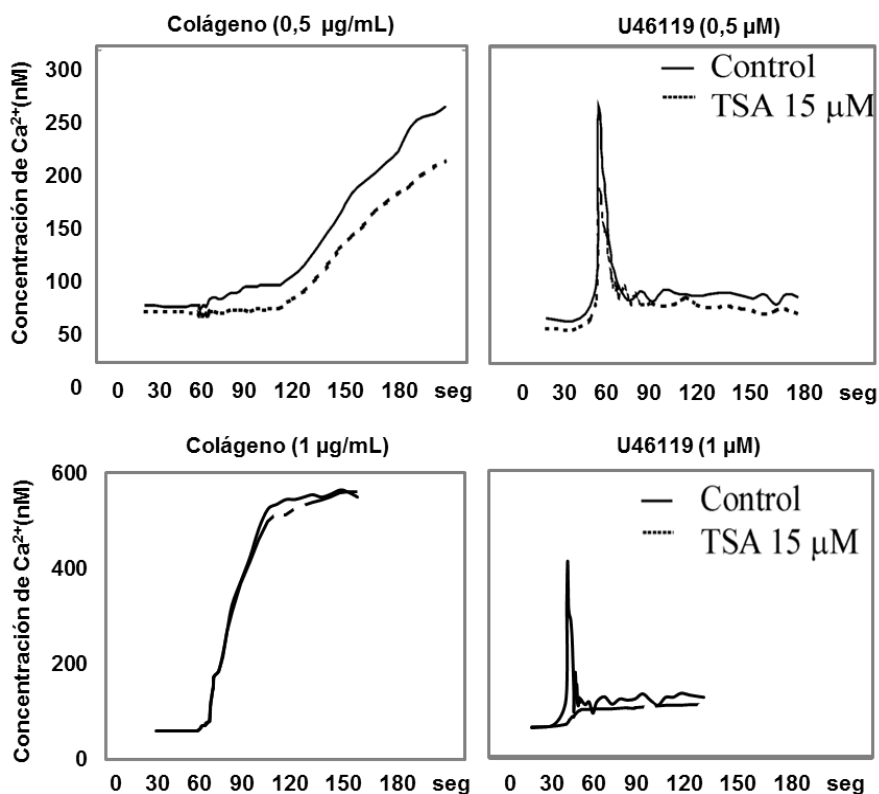
#### 4.6.2. Regulación de los movimientos de Ca<sup>2+</sup> por las HDAC

El incremento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático es una de las respuestas plaquetarias más importantes y resulta imprescindible para muchos de los procesos desencadenados por la activación plaquetaria<sup>128</sup>.

Además, varios autores han destacado la importancia del citoesqueleto en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol de las plaquetas<sup>129,130</sup>. Sin embargo, poco se sabe del papel jugado por las HDAC en el control de los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plaquetas.

Por ello, nos planteamos observar qué ocurría con los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en plaquetas que habían sido previamente incubadas con TSA. Para realizar este estudio se utilizaron plaquetas “cargadas” de FURA-2/AM. Posteriormente, fueron estimuladas con dos dosis distintas de colágeno y U46619.

En la Figura 4.18 se puede ver que en la muestra con TSA se produjo una disminución parcial del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  al estimular a las plaquetas con los distintos agonistas. Sin embargo, esta inhibición no se observaba con dosis superiores de agonistas.



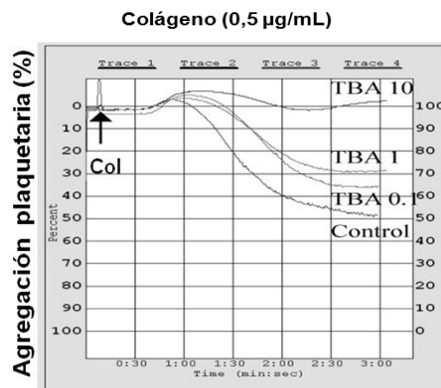
**Figura 4.18. El TSA provoca una disminución del Ca<sup>2+</sup> en plaquetas estimuladas con colágeno o U46619.** Plaquetas cargadas con FURA-2/AM se incubaron (1 h., a 37°C) con el solvente (Control) o con TSA (15 µM), se registró la fluorescencia durante 1 min y se estimularon en agitación con colágeno (1 y 0,5 µg/mL) o U46619 (1 y 0,5 µM). Se registraron los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> durante 2 min. Tanto el estímulo, a dosis bajas, con colágeno o U46619 en plaquetas preincubadas con TSA, tienen una disminución significativa del Ca<sup>2+</sup> con respecto a sus controles, pero al doblar la dosis del estímulo, no hay inhibición significativa. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

#### 4.7. Efectos de la inhibición específica de la HDAC6 con Tubastatin A

Como hemos visto en los apartados anteriores, las HDAC regulan distintos aspectos funcionales de la plaqueta como la agregación, la liberación de gránulos densos o los incrementos de

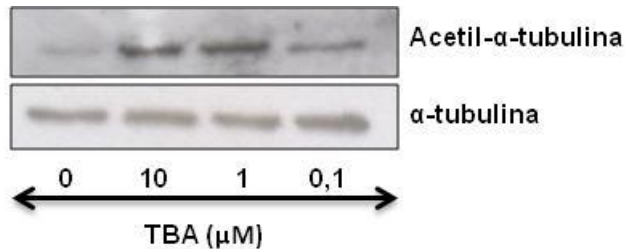
Ca<sup>2+</sup>. Estos efectos están mediados, al menos parcialmente, a través del control de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. En conjunto, estos resultados sugieren que la HDAC6 podría ser la histona deacetilasa responsable de la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas y de sus implicaciones funcionales.

Sin embargo, el TSA no es un inhibidor específico de HDAC6, por lo que no podemos decir con certeza que los efectos observados son debidos exclusivamente a su inhibición. Para aclarar este punto, decidimos utilizar un inhibidor específico de la HDAC6, el Tubastatin A (TBA)<sup>104</sup>. Las plaquetas se preincubaron durante 1 hora a 37°C, con concentraciones crecientes de TBA (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). Después se indujo la agregación plaquetaria con colágeno 0,5  $\mu$ g/mL. Los resultados obtenidos (Figura 4.19) son muy similares a la inhibición observada con el tratamiento con TSA, es decir, a mayor concentración del inhibidor mayor inhibición de la agregación plaquetaria respecto al control.



**Figura 4.19. El TBA produce una disminución de la agregación plaquetaria al colágeno.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con tampón (Control) o dosis creciente de TBA (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) y se estimulan con colágeno (0,5  $\mu$ g/mL). Se registró la agregación durante 3 min y se evaluó el porcentaje de agregación máxima. Los resultados muestran que a mayor concentración del inhibidor la agregación plaquetaria es menor. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

También se observó lo que pasaba con el nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. En la Figura 4.20 se observa que el TBA induce la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina, de forma dosis dependiente, similar a lo que ocurría con la incubación con el TSA (Figura 4.4). Estos resultados demuestran que en plaquetas humanas HDAC6 es la enzima responsable de la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina.



**Figura 4.20. El TBA induce la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con dosis creciente de TBA (0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). A los 3 min se lisaron las plaquetas y se detectó la  $\alpha$ -tubulina acetilada. La incubación de las plaquetas con TBA induce acetilación de la  $\alpha$ -tubulina de manera dosis dependiente. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

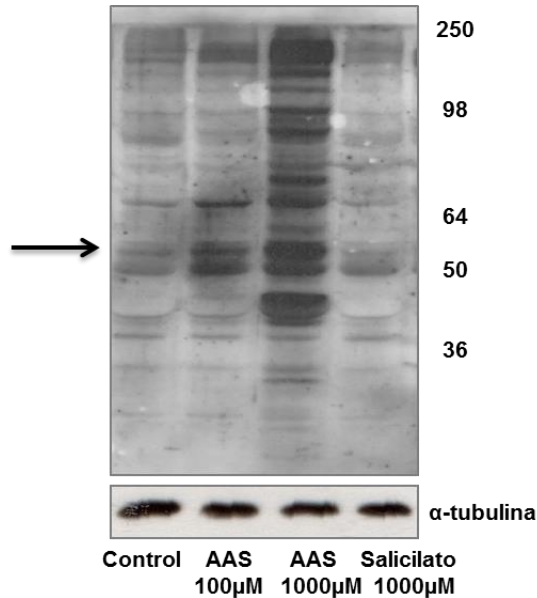
#### 4.8. El patrón de proteínas acetiladas en Lys en las plaquetas humanas se altera por la acción del AAS

Hasta el momento hemos demostrado que en plaquetas humanas existe un patrón de proteínas acetiladas en Lys característico, pero ¿qué pasa con la acetilación de las proteínas plaquetarias si utilizamos un agente acetilante como es el AAS?

El AAS, es decir, el ácido acetil salicílico, es un agente acetilante bien conocido, sobre todo por su capacidad de acetilar la COX-1 de las plaquetas<sup>131</sup>. Esta enzima metaboliza el paso clave de la conversión del ácido araquidónico a TXA<sub>2</sub>, necesario para la agregación plaquetaria. El AAS actúa acetilando a la Ser<sup>529</sup>, que se

encuentra en la entrada del centro activo, inhibiendo de manera irreversible a la COX-1 al impedir el acceso del ácido araquidónico a su centro activo. Por otra parte, diversos autores han demostrado la capacidad que tiene el AAS de acetilar otras proteínas, como el fibrinógeno o la p-53<sup>132,133</sup>. Sin embargo, no sabemos si es capaz de alterar el patrón de proteínas acetiladas en Lys de las plaquetas humanas.

Para dar respuesta a esta pregunta, realizamos diversos experimentos con el AAS. Primero, partimos de plaquetas humanas lavadas y ajustadas a  $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ L. Se incubaron con el solvente (control) o con AAS a diversas concentraciones (100  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M). Como control negativo empleamos el salicilato (1000  $\mu$ M). El salicilato es la misma molécula que el AAS, pero sin el grupo acetilo y por tanto sin capacidad acetilante. A los 10 minutos las plaquetas se lisaron con tampón RIPA y se detectaron las proteínas acetiladas empleando el anticuerpo específico contra las Lys acetiladas. En la Figura 4.21 se observa la presencia de varias proteínas que aumentan el nivel de acetilación con respecto al control de forma dosis dependiente, a mayor concentración del AAS mayor número de proteínas acetiladas en Lys. Por otra parte, la muestra con salicilato es muy similar a la muestra control.

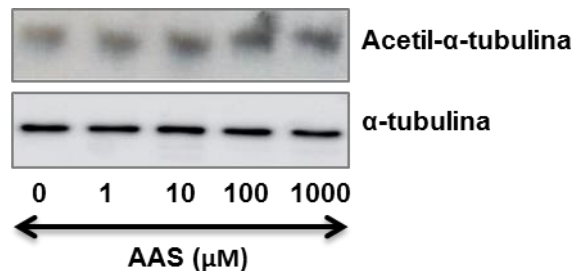


**Figura 4.21. El efecto del AAS en la acetilación de proteínas en plaquetas humanas.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con tampón (control) o con AAS (100 µM y 1000 µM) y salicilato (1000 µM). A los 10 min las plaquetas se lisan y se detectan las proteínas acetiladas en Lys. El AAS provoca cambios en el patrón de proteínas acetiladas de las plaquetas con respecto al control. Una proteína de tamaño molecular aproximado de 50 kDa también aumenta su nivel de acetilación (indicación con flecha). La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. A la derecha de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa) de algunas proteínas identificadas. En la parte inferior se muestra la cantidad de α-tubulina como control de carga.

Entre las proteínas acetiladas en Lys por el AAS hay de nuevo una proteína con un tamaño aproximado de 50 kDa que se acetilada de manera significativa. Se ha demostrado que en otros tipos celulares el AAS es capaz de acetilar a la α-tubulina<sup>134</sup>. Por tanto, nos preguntamos si la proteína de unos 50 kDa que observamos en la imagen anterior es la α-tubulina en su forma acetilada.

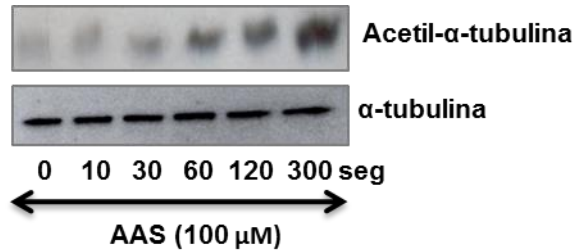


Para ello, decidimos realizar un experimento que consistió en incubar las plaquetas con distintas dosis de AAS (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ) y detectar la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. El resultado que se obtuvo fue que en plaquetas en reposo (AAS 0  $\mu\text{M}$ ) la  $\alpha$ -tubulina se encuentra parcialmente acetilada, como ya sabíamos, pero con el tratamiento con distintas dosis de AAS se produce un incremento considerable de su nivel de acetilación de manera dosis dependiente (Figura 4.22).



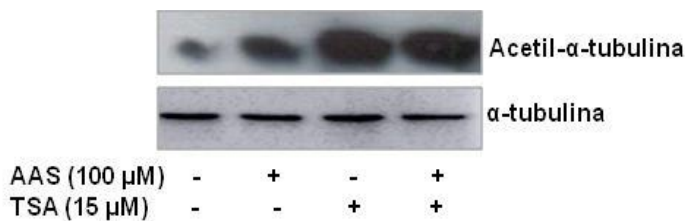
**Figura 4.22. El AAS produce acetilación de la  $\alpha$ -tubulina de manera dosis dependiente.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) a dosis creciente de AAS (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  o 1000  $\mu\text{M}$ ). A los 10 min se lisaron las plaquetas y se detectó la  $\alpha$ -tubulina acetilada. La incubación de las plaquetas con AAS induce acetilación de la  $\alpha$ -tubulina de manera dosis dependiente. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Decidimos repetir el experimento anterior pero en esta ocasión mantenemos una dosis fija de AAS de 100  $\mu\text{M}$  y realizamos una cinética de tiempos (1, 10, 30, 60, 120 y 300 seg), observamos que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina aumenta con el tiempo de incubación (Figura 4.23).



**Figura 4.23. El AAS produce acetilación de la  $\alpha$ -tubulina con una cinética de tiempo.** Las plaquetas se incubaron con 100  $\mu\text{M}$  de AAS a distintos tiempos (0 a 300 seg). Pasado el tiempo de incubación las plaquetas se lisaron y se inmunodetectó la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. A mayor tiempo de incubación más acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Llegados a este punto, nos planteamos investigar qué ocurría con el nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina si se tratan simultáneamente las plaquetas con TSA y AAS. Decidimos incubar a las plaquetas con 15  $\mu\text{M}$  de TSA y 100  $\mu\text{M}$  de AAS, durante 10 minutos. Observamos que la incubación simultánea con AAS y TSA no aumentó la acetilación sobre el nivel alcanzado con cualquiera de los productos por separado. (Figura 4.24).



**Figura 4.24. El AAS y TSA producen acetilación de la  $\alpha$ -tubulina.** Las plaquetas se incubaron (10 min) con AAS (100  $\mu\text{M}$ ), TSA (15  $\mu\text{M}$ ) o ambos. A los 10 min se lisaron y se inmunodetectó la forma acetilada de la  $\alpha$ -tubulina. Ambos producen un aumento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina con respecto a la muestra sin TSA y sin AAS, aunque al unirlos no se produce un efecto acumulativo. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

#### 4.9. Regulación de la función de las plaquetas por las sirtuinas

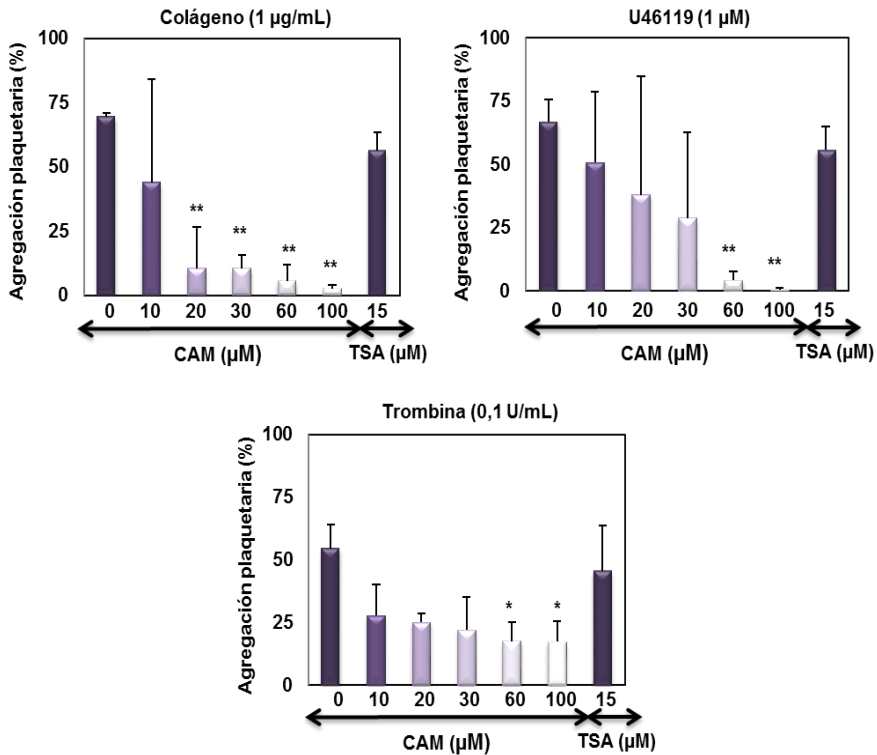
Como hemos visto en los apartados anteriores, las HDAC clásicas juegan un papel importante en la regulación de la función plaquetaria. A dosis bajas de agonista (0,5  $\mu\text{g/mL}$  de colágeno o con 0,5  $\mu\text{M}$  de U46619) el TSA es capaz de inhibir la agregación plaquetaria, la liberación de gránulos densos y los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Todo esto, al menos parcialmente, mediante la regulación del proceso de acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Sin embargo, a concentraciones superiores de agonista se superaba el efecto inhibitor del TSA.

Sin embargo, hemos de tener en cuenta, que dentro de la familia de las HDAC encontramos a la Clase III, comúnmente conocidas como sirtuinas, que tienen una estructura totalmente diferente a las HDAC clásicas, requieren como cofactor el  $\text{NAD}^{+}$ <sup>83</sup> y además son inhibidas por la NAM o CAM, pero no por el TSA<sup>135</sup>. Además, varias de ellas son de localización citoplasmática o mitocondrial<sup>186</sup>, lo que las hace especialmente interesantes en relación con las plaquetas, aunque no existen estudios previos que hayan evaluado su presencia o participación en algún aspecto de la función plaquetaria. Por ello nos planteamos estudiar el papel de las sirtuinas en la función plaquetaria, a nivel de la agregación plaquetaria, la liberación de gránulos densos, los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la síntesis de  $\text{TXA}_2$ , así como evaluar los posibles mecanismos de transmisión de señales implicados.

#### 4.9.1. Regulación de la agregación plaquetaria por las sirtuinas

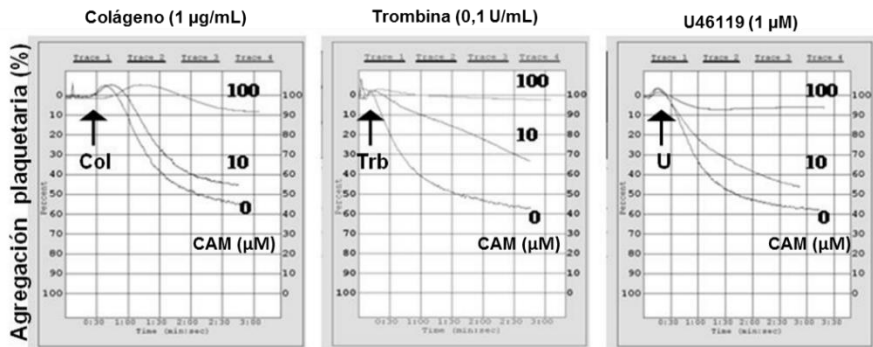
En primer lugar, evaluamos la participación de las sirtuinas en la agregación plaquetaria. Partimos de plaquetas lavadas que se incubaron durante 1 hora a 37° con el CAM, a distintas dosis (0, 10, 20, 30, 60 y 100  $\mu$ M). Para comparar con el efecto de las HDAC clásicas se empleó el TSA (15  $\mu$ M). Para inducir la agregación plaquetaria se utilizaron distintos agonistas, como el colágeno 1  $\mu$ g/mL, la trombina 0,1 U/mL y el U46619 1 $\mu$ M. En la Figura 4.25 se observa que se producía una inhibición dosis dependiente con el inhibidor de sirtuinas. Este hecho ocurría con cualquiera de los agonistas utilizados.

Sin embargo, con estas dosis de agonista no se produjo disminución de la agregación de las plaquetas tratadas con TSA. Pero cabe recordar que a dosis más bajas de agonistas, sí que se observaba una disminución significativa por el TSA de la agregación plaquetaria (Figura 4.12).



**Figura 4.25. El efecto del CAM sobre la agregación plaquetaria.** Las plaquetas se incuban (1h., a 37°) con distintas dosis de CAM o TSA (dosis única). A la hora se estimulan con colágeno (1 μg/mL), U46619 (1 μM) o trombina (0,1 U/mL). Se registra la agregación durante 3 min y se evalúa el porcentaje de agregación máxima. El CAM provoca una inhibición dosis dependiente de la agregación cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno, trombina y U46619. Pero no ocurría lo mismo con el TSA. \*p<0.005 \*\*p<0.001. n=10.

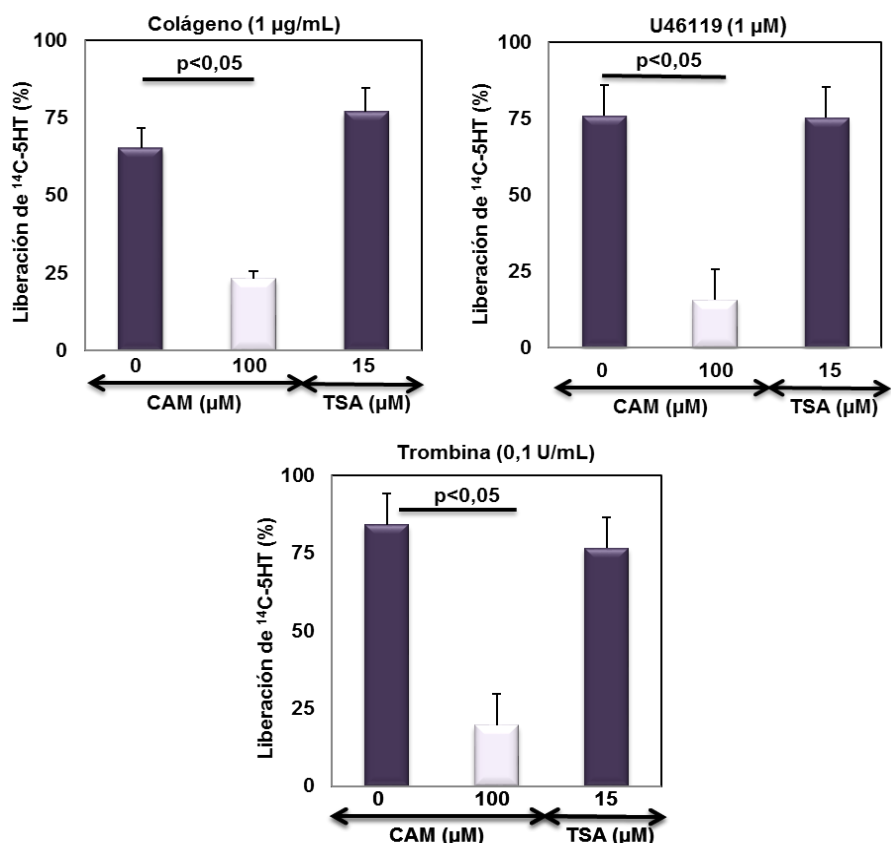
En la Figura 4.26 se puede observar un ejemplo representativo del efecto del CAM sobre la agregación plaquetaria, a dos dosis distintas. Ambas concentraciones de inhibidor producen una disminución significativa de la agregación plaquetaria. Parece por tanto, que las sirtuinas tienen un papel más importante que las HDAC clásicas sobre la función plaquetaria.



**Figura 4.26. El CAM reduce la agregación plaquetaria al estimular con diferentes agonistas.** El CAM a distintas concentraciones (0  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) produce una inhibición dosis dependiente, para todos los agonistas empleados (colágeno 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , trombina 0,1 U/mL y U444619 1  $\mu\text{M}$ ). La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. (Col: colágeno, Trb: trombina, U: U46619).

#### 4.9.2. Regulación de la liberación de gránulos densos por las sirtuinas

El siguiente paso fue estudiar si el CAM era capaz de disminuir la secreción de gránulos densos. Los resultados muestran que al incubar las plaquetas con CAM (100  $\mu\text{M}$ ), se producía una reducción significativa de la liberación de serotonina, incluso a las dosis en las que el TSA (15  $\mu\text{M}$ ) no tiene efecto inhibitorio. Este hecho se repetía en todos los agonistas, tanto con colágeno (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), como con trombina (0,1 U/mL) o con el U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4.27).

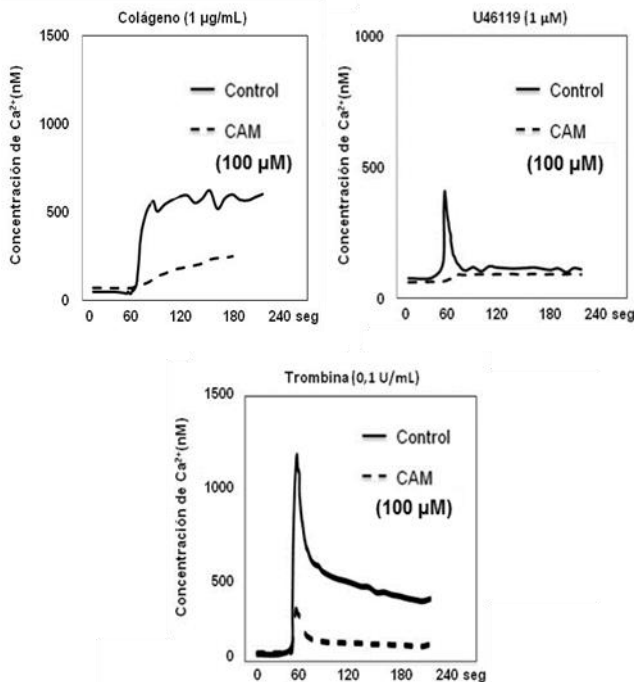


**Figura 4.27. El CAM provoca la disminución de la liberación de los gránulos densos.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C) con el inhibidor CAM (0 y 100 µM) o el TSA (15 µM), y se estimulan con colágeno (1 µg/mL), trombina (0,1 U/mL) o con U46619 (1 µM). Se registra la agregación durante 3 min y se evalúa la liberación de la <sup>14</sup>C-5HT. Al estimular con los distintos agonistas, las plaquetas tratadas con CAM presentan una disminución significativa de la liberación de los gránulos densos, hecho que no ocurría con el TSA. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

#### 4.9.3. Regulación de los movimientos de Ca<sup>2+</sup> por las sirtuinas

El incremento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático es una de las más importantes respuestas plaquetarias al estímulo, por lo que decidimos estudiar su regulación por las sirtuinas. En la Figura 4.28 podemos observar que el CAM (100 µM) provoca una disminución

significativa de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto al control. Esta inhibición era muy superior a la observada con el TSA (Figura 4.17), de forma paralela a lo observado con la agregación o la liberación de gránulos densos.



**Figura 4.28. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye en plaquetas preincubadas con CAM.** Las plaquetas cargadas con FURA-2/AM se incuban (1 h., 37°C) con tampón (control) o con CAM (100  $\mu\text{M}$ ), se registra la fluorescencia durante 1 min y se estimulan en agitación con colágeno (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), trombina (0,1 U/mL) o U46619 (1  $\mu\text{M}$ ). Se registran los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 2 min. Tanto el estímulo con colágeno, trombina o U46619 en plaquetas tratadas con CAM, tienen una disminución significativa de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a sus controles. La imagen es la media de 5 experimentos diferentes.

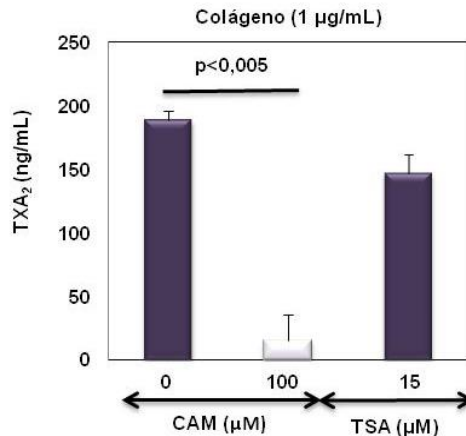
#### 4.9.4. Regulación de la síntesis de $\text{TXA}_2$ por las sirtuinas

La síntesis de  $\text{TXA}_2$  es el resultado de la acción consecutiva de varios sistemas enzimáticos, que se produce cuando las plaquetas se activan en presencia de un agonista. En primer lugar,



se produce la activación de la cPLA<sub>2</sub> por el aumento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y su fosforilación mediada por MAPK<sup>40</sup>. A continuación, se activa la cPLA<sub>2</sub>, libera el AA de los fosfolípidos de la membrana y finalmente éste es metabolizado por el sistema COX-1/TXA<sub>2</sub> sintetasa, hasta producir el TXA<sub>2</sub> (entre otros eicosanoides)<sup>36</sup>.

Para comprobar si las sirtuinas alteraban de alguna manera estos procesos enzimáticos, utilizamos el TSA, como inhibidor de las HDAC clásicas y el CAM, como inhibidor de las sirtuinas. Después de incubar las muestras durante una hora con los inhibidores, se estimularon con colágeno (1 µg/mL) durante 3 minutos. Los niveles de TXA<sub>2</sub> se midieron por ELISA. En la Figura 4.29 observamos cómo el CAM produjo una disminución significativa de la síntesis del TXA<sub>2</sub> con respecto a la muestra sin tratar. En cambio, aunque el TSA mostró una clara tendencia inhibitoria ésta no resultó significativa, al menos a las concentraciones de agonistas empleadas.

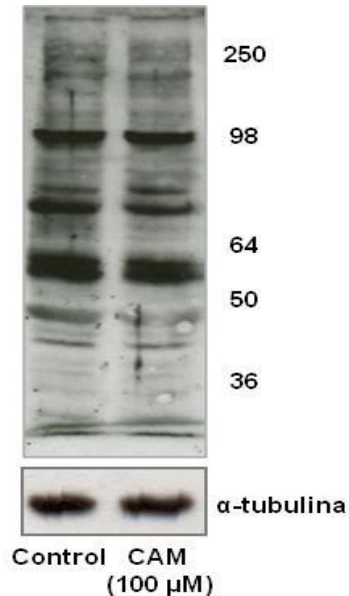


**Figura 4.29. El efecto del CAM sobre la síntesis de TXA<sub>2</sub> en plaquetas estimuladas con colágeno.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°C), con CAM (0 µM y 100 µM) o con TSA (15 µM) y, se estimularon con colágeno (1 µg/mL). A los 3 min se detuvo la síntesis de TXA<sub>2</sub> y se detectó la cantidad de TXA<sub>2</sub> por ELISA. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

#### 4.9.5. Regulación de la acetilación de proteínas en las plaquetas humanas por las sirtuinas

Si recordamos los primeros resultados obtenidos (Figura 4.1, 4.2 y 4.3), en las plaquetas en reposo aparece un patrón de proteínas acetiladas en Lys, el cual se altera ligeramente cuando las plaquetas son estimuladas con un agonista fisiológico, como es el colágeno. Además, si a estas plaquetas se las trata con el TSA, la  $\alpha$ -tubulina se acetilaba de manera significativa. ¿Pero, qué ocurre con este patrón si se trata las plaquetas con el CAM<sup>86</sup> un inhibidor general de las Sirtuinas?

Para estudiar los efectos del CAM en el nivel de acetilación de las proteínas plaquetarias, se utilizaron plaquetas lavadas y en reposo. Éstas se incubaron con tampón (control) o con 100  $\mu$ M de CAM. A la hora se lisaron las muestras con tampón RIPA y se inmunodetectaron las proteínas acetiladas en Lys. Inesperadamente, como se observa en la Figura 4.30, el CAM provoca pocos cambios en el nivel de acetilación de las proteínas plaquetarias. Las diferencias con el Control no resultaban tan llamativas como las encontradas al tratar las plaquetas con el TSA (Figura 4.3). Sin embargo, debido a las limitaciones de sensibilidad propias de la técnica, no podemos descartar que se esté produciendo la acetilación de otras proteínas menos abundantes.

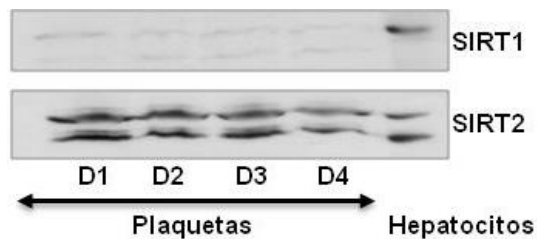


**Figura 4.30. La inhibición de las sirtuinas provoca pocos cambios en la acetilación de las Lys de proteínas plaquetarias humanas en reposo.** Las plaquetas se incuban (1 h., a 37°C) con tampón (control) o con CAM (100  $\mu$ M). A la hora las plaquetas se lisan y se detectan las proteínas acetiladas. No se observan cambios significativos entre la muestra control y la de CAM. A la derecha de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa). La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

#### 4.10. Presencia de las sirtuinas en las plaquetas humanas

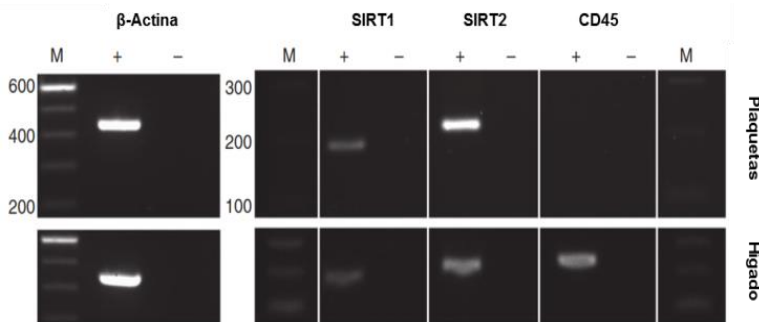
Actualmente se han descrito 7 sirtuinas diferentes, en distintos tipos celulares<sup>135</sup>. Estas enzimas pueden también tener diferentes localizaciones dentro de la célula: SIRT1 y SIRT2 se localizan en citoplasma, y el resto de las sirtuinas en el núcleo y/o mitocondria. Dado que las plaquetas no poseen núcleo, la SIRT1 y la SIRT2, pueden ser buenas candidatas para que se encuentren en las plaquetas humanas y participen en la regulación de la función plaquetaria.

Por ello, nos planteamos el estudio de la presencia de SIRT1 y SIRT2 en las plaquetas humanas. Partimos de lisados plaquetarios de varios donantes, y repetimos el mismo proceso que se utilizó para detectar la HDAC6. Se identificó la presencia de estas enzimas empleando anticuerpos específicos para SIRT1 y para SIRT2. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 4.31, donde se aprecia que SIRT2 estaba presente en plaquetas humanas, apareciendo como un doblete, similar a la muestra de hepatocitos que se utilizaron como control positivo<sup>91</sup>. Sin embargo, SIRT1 aparecía de forma muy débil en las plaquetas, incluso cuando se aumentó el número de plaquetas lisadas a  $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ , aunque sí era claramente visible en la muestra control de hepatocitos.



**Figura 4.31. La SIRT1 y la SIRT2 están presente en plaquetas humanas.** Las plaquetas lavadas ( $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) procedentes de 4 donantes distintos (D1-D4), fueron lisadas con tampón RIPA y inmunodetectadas con un anticuerpo anti-SIRT1 y anti-SIRT2. Una muestra de hepatocitos lisados ( $1 \times 10^6$  células/mL), se corrió en paralelo como muestra control. En todos los donantes la SIRT2 estaba presente en plaquetas humanas procedentes de donantes distintos en cantidad mucho más importante que SIRT1. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

Para confirmar estos resultados, se analizó la presencia del ARNm de SIRT1 y SIRT2 en las plaquetas. En la Figura 4.32 podemos observar que tanto el ARNm de SIRT2 como de SIRT1 estaban presentes en las plaquetas humanas, aunque la cantidad de SIRT2 era claramente superior a SIRT1. Este resultado está en concordancia con la cantidad de proteínas encontrada.

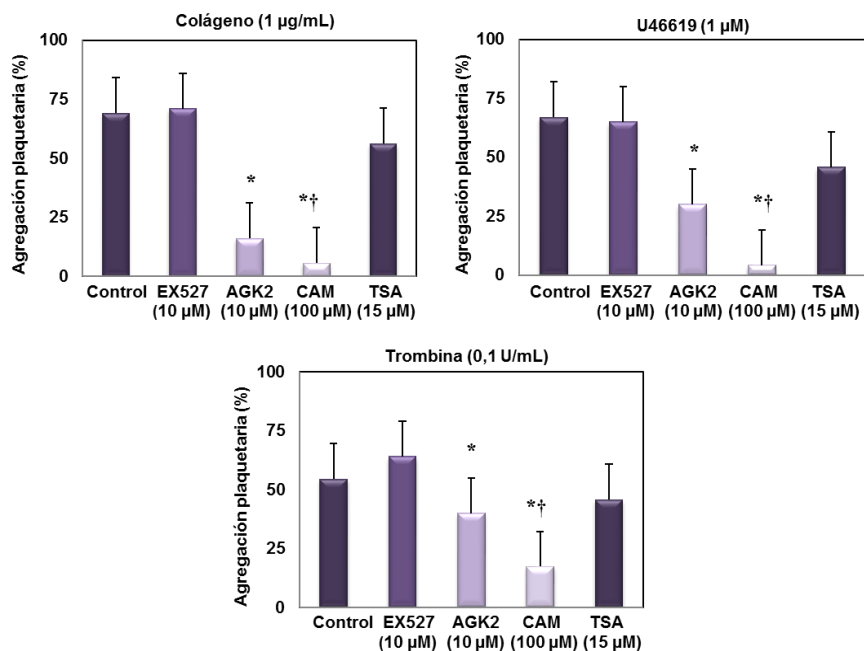


**Figura 4.32. El ARNm de SIRT1 y SIRT2 está presente en plaquetas humanas.** El ARN total de las plaquetas se retrotranscribió en presencia (+) o ausencia (-) de la transcriptasa inversa *Moloney murine leukemia Virus*. El ADN complementario resultante se amplificó por PCR durante 35 ciclos con cebadores específicos para SIRT1, SIRT2 y CD45. Las alícuotas (15  $\mu$ L) de las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con SYBR Green Safe. Tanto el ARNm de la SIRT1 como de la SIRT2 están presentes en las plaquetas humanas. A la izquierda de la imagen se señalan los pesos moleculares. La  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador amplificándose 25 ciclos.

#### 4.10.1. Influencia de SIRT2 en la función plaquetaria

Para estudiar la influencia de la SIRT2 en la función plaquetaria utilizamos diferentes inhibidores de sirtuinas: CAM (100  $\mu$ M), EX527 (10  $\mu$ M) (inhibidor específico de SIRT1) y AGK2 (10  $\mu$ M) (inhibidor específico de SIRT2). Las concentraciones elegidas eran las empleadas por diversos autores en otros tipos celulares<sup>136,137</sup>. En la Figura 4.33, la inhibición específica de la SIRT1 no afectó a la agregación plaquetaria inducida por los agonistas empleados. En cambio, la inhibición de SIRT2 provocó una inhibición significativa de la agregación con todos los agonistas, especialmente con el colágeno. Sin embargo, la inhibición obtenida era inferior a la conseguida con el CAM.

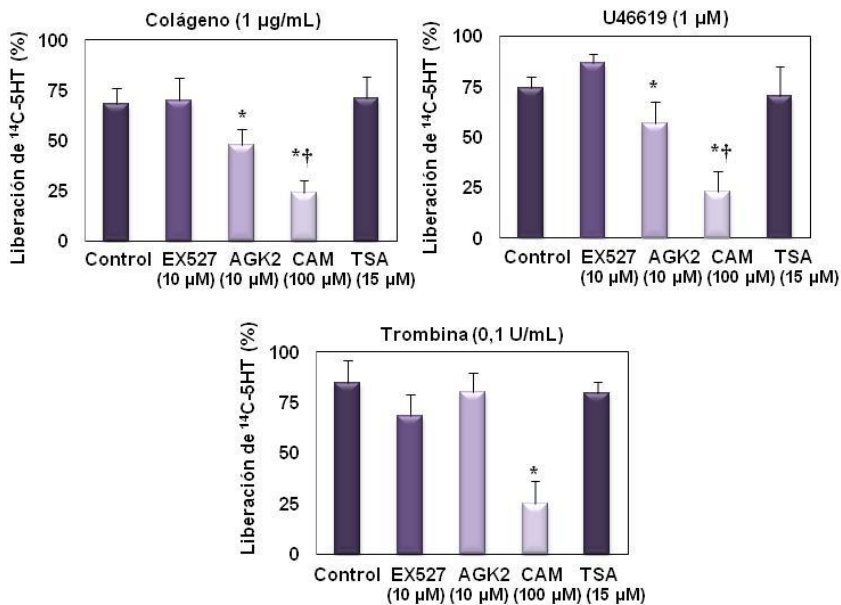
## 4. Resultados



**Figura 4.33. La SIRT2 regula la agregación plaquetaria.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a 37°) con el tampón (control), EX527 (10 µM), AGK2 (10 µM), CAM (100 µM) o TSA (15 µM). A la hora se estimularon con colágeno (1 µg/mL), trombina (0,1 U/mL) o U46619 (1 µM). Se registró la agregación durante 3 min y se evaluó el porcentaje de agregación máxima. La inhibición de SIRT1 no afectó a la agregación plaquetaria, en cambio la inhibición de SIRT2 inhibe la agregación plaquetaria a cualquiera de los agonistas, aunque el CAM produce la mayor inhibición de todas. \*p<0,05, AGK2 o CAM frente a Control; †p<0,05 CAM vs AGK2. n=5

Resultados similares encontramos con la liberación de gránulos densos. La inhibición específica de la SIRT2 producía una disminución significativa de la liberación, cuando las plaquetas eran estimuladas por colágeno o U46619 (Figura 4.34). En contraste, la liberación de la serotonina inducida por el estímulo de la trombina no se inhibía por el AGK2, aunque sí fue significativamente reducida por la inhibición del CAM.

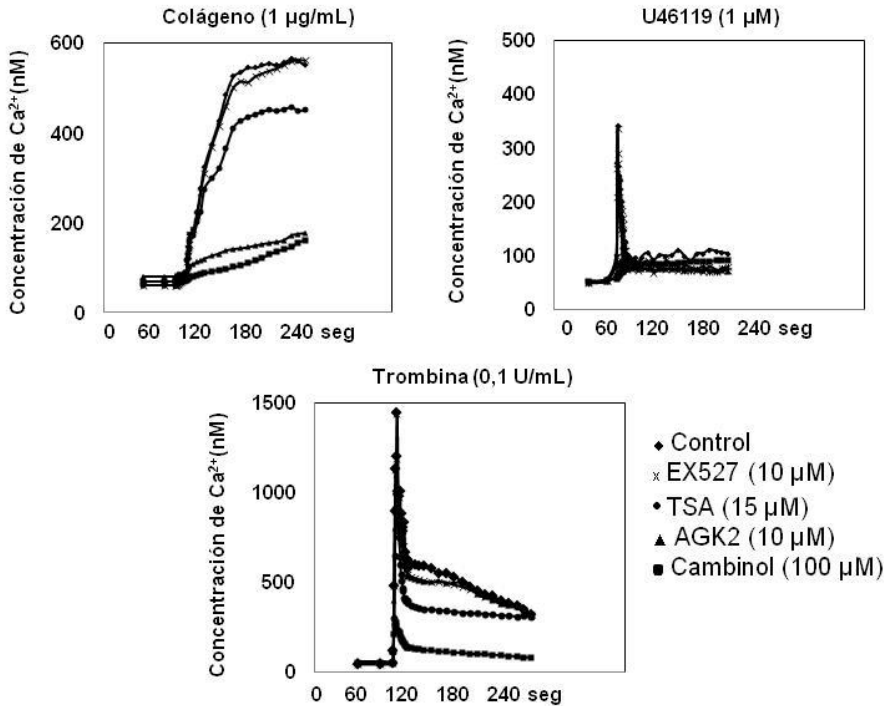
Para comprobar el nivel al que las sirtuinas regulaban la liberación de gránulos, las plaquetas se estimularon con ionóforo. El tratamiento con CAM, AGK2 o EX527 no afectó a la liberación de serotonina (control, 91%; CAM, 83%; AGK2, 92%; EX527, 86%) sugiriendo que el punto regulado por SIRT2 se encuentra antes del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 4.34. El AGK2 provoca la disminución de la liberación de gránulos densos.** Las plaquetas se incubaron (1 h., a  $37^\circ\text{C}$ ) con tampón (control) o con los inhibidores: EX527 (10  $\mu\text{M}$ ), AGK2 (10  $\mu\text{M}$ ), CAM (100  $\mu\text{M}$ ) o TSA (15  $\mu\text{M}$ ), y se estimulan con colágeno (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), trombina (0,1 U/mL) o con U46619 (1  $\mu\text{M}$ ). Se registra la agregación durante 3 min y se evalúa la liberación de  $^{14}\text{C}$ -5HT. Tanto el estímulo con colágeno, trombina o U46619 en plaquetas preincubadas con AGK2 o CAM, tienen una disminución de la liberación de serotonina, cosa que no ocurre con el TSA.  $n=5$ ,  $*p<0,05$ . \* AGK2 o CAM vs control; † $p<0,05$ CAM vs AGK2.

Para comprobar este punto, se estudiaron los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y su regulación por las sirtuinas. La inhibición de la SIRT1 no produjo ningún cambio significativo, independientemente del agonista utilizado. Por su parte, el TSA indujo una inhibición

parcial cuando las plaquetas eran estimuladas con colágeno y U46619. Con respecto a la inhibición de la SIRT2 por el AGK2, el efecto sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático fue muy similar al producido por CAM, excepto con la trombina, donde el efecto del AGK2 fue menor (Figura 4.35).



**Figura 4.35. La SIRT2 regula la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.**

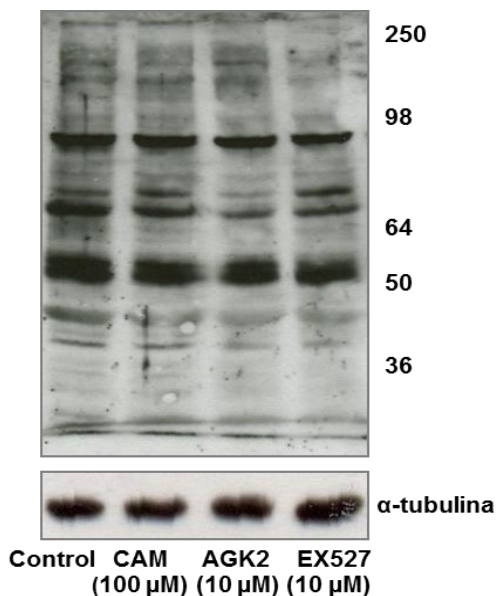
Las plaquetas cargadas con FURA-2/AM se incubaron (1 h., a 37°C) con tampón (control) o con EX527 (10 µM), AGK2 (10 µM), CAM (100 µM) o TSA (15 µM), y se estimularon con colágeno (1 µg/mL), trombina (0,1 U/mL) o con U46619 (1 µM). El AGK2 y el CAM producen la mayor disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . La imagen es la media de 5 experimentos diferentes.



#### **4.10.2. Influencia de las sirtuinas en nivel de acetilación de las Lys de proteínas plaquetarias humanas**

Con respecto al patrón de proteínas acetiladas en Lys, decidimos estudiar el efecto sobre el mismo de los distintos inhibidores de las sirtuinas: CAM, AGK2 o EX527. El patrón de acetilación de las Lys de las plaquetas de la muestra control era muy similar al patrón obtenido por los distintos inhibidores (Figura 4.36), no encontrándose ninguna variación evidente en el nivel de acetilación de las Lys. Cabe recordar que con el TSA sí que se producía la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina (Figura 4.36). Este resultado contrastaba con el marcado efecto de la inhibición de SIRT2 sobre la agregación de plaquetas, la liberación de gránulos densos y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por agonistas (Figura 4.26, 4.27 y 4.28 o Figura 4.33, 4.34 y 4.35).

Sin embargo, debido a las limitaciones de sensibilidad propias de la técnica, no podemos descartar que se esté produciendo la acetilación de otras proteínas menos abundantes.



**Figura 4.36. La inhibición de las sirtuinas no provoca grandes alteraciones en el patrón de proteínas acetiladas Lys de las plaquetas humanas en reposo.** Las plaquetas se incubaron (1 h., 37°C) con el tampón (Control) o con CAM (100 μM), AGK2 (10 μM) o EX527 (10 μM). A la hora las plaquetas se lisaron, se detectaron las proteínas acetiladas en Lys por inmunodetección. No se observaron cambios significativos en el patrón, entre la muestra Control y los distintos inhibidores. A la izquierda de la imagen se señalan los pesos moleculares (kDa). La imagen es la media de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de α-tubulina como control de carga.

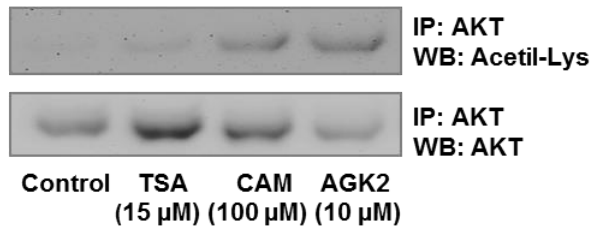
#### 4.11. Regulación de la acetilación de AKT/PKB mediada por Sirtuinas

El CAM afectaba muy ligeramente al patrón de proteínas acetiladas en Lys de las plaquetas, a pesar de los efectos tan evidentes que tiene sobre la función plaquetaria. Este hecho se podría explicar por el hecho de que las técnicas empleadas son limitantes y sólo estamos detectando una pequeña fracción de proteínas acetiladas, como sugieren los estudios de proteómica en otros tipos celulares<sup>68</sup>. Sin embargo, nuestros resultados previos

sobre la función podrían sugerir que alguna proteína implicada en los mecanismos de transmisión de señales de las plaquetas, podría ser diana de las sirtuinas.

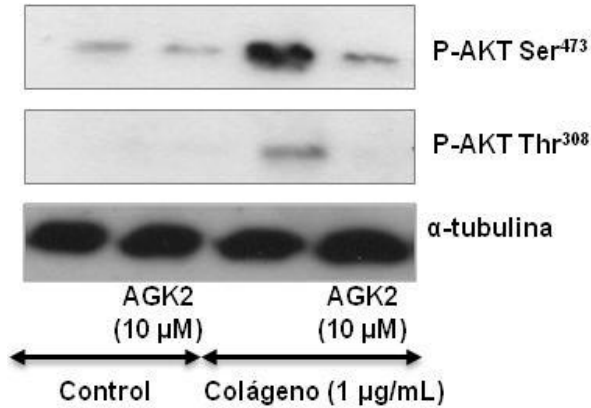
AKT/PKB es una de las enzimas clave implicadas en la transducción de señales en las plaquetas, participa en la agregación plaquetaria, la liberación de gránulos densos y los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>138,139</sup>. Además, se ha descrito cómo en otros tipos celulares la actividad de AKT está regulada por procesos de acetilación<sup>140</sup>. Por lo tanto, ésta proteína podría ser una buena candidata para que, las plaquetas, su actividad sea regulada.

Para probar esta hipótesis, se incubaron las plaquetas con los inhibidores: AGK2, CAM, TSA o sin inhibidores. Después de una incubación de 1 hora a 37°C, se inmunoprecipitó AKT y se detectó su nivel de acetilación con el anticuerpo contra las proteínas acetiladas en Lys. En los resultados obtenidos se puede observar que el nivel de acetilación de la AKT se encuentra aumentado en la muestra incubada con AGK2 y CAM, mientras que la cantidad total de AKT se mantiene sin cambios (Figura 4.37). Por su parte, el TSA no indujo cambios en la acetilación de AKT.



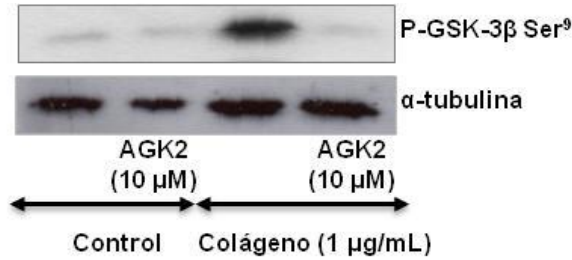
**Figura 4.37. La incubación con AGK2 o CAM aumenta el nivel de acetilación de la AKT en plaquetas en reposo.** Las plaquetas lavadas fueron incubadas durante 1 h. a 37°C con: 15 μM de TSA, 100 μM de CAM, 10 μM de AGK2 o con el tampón (control). Después se lisaron las plaquetas y se inmunoprecipitó AKT. Posteriormente se utilizó el anticuerpo contra proteínas acetiladas en Lys. El nivel de acetilación de AKT se encuentra aumentado en la muestra preincubada con AGK2 y CAM con respecto al control. La imagen es representativa de 3 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de AKT como control de la inmunoprecipitación.

El resultado anterior indica que AKT se acetila en presencia de inhibidores de las sirtuinas, más específicamente con la inhibición de la SIRT2. Nos planteamos entonces si podía existir alguna interferencia entre los procesos de acetilación y fosforilación de AKT. Para ello observamos el estado de fosforilación de AKT, tanto en la Ser<sup>473</sup> como en la Thr<sup>308</sup>, ya que éste es un requisito que marca la actividad de AKT<sup>139</sup>. En la Figura 4.38 se puede ver que en plaquetas en reposo la AKT apenas está fosforilada, en ambos residuos, y la incubación con el AGK2 no modifica la fosforilación de AKT. La agregación inducida por el colágeno incrementó de forma significativa el nivel de fosforilación de AKT, como se ha descrito previamente<sup>138,139</sup>. Sin embargo, cuando las plaquetas son incubadas con el inhibidor de la SIRT2, previamente a la estimulación con colágeno, ya no se produce ningún incremento en la fosforilación de ninguno de los dos residuos de la AKT, lo que sugiere un efecto de la acetilación sobre la función de AKT.



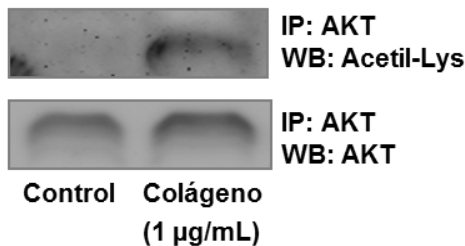
**Figura 4.38. La incubación con AGK2 disminuye la fosforilación de la AKT en plaquetas estimuladas.** Las plaquetas en reposo (control) o plaquetas estimuladas con colágeno (1 µg/mL) fueron preincubadas (1 h., a 37°C), con o sin AGK2. A los 3 min de la agregación las muestras fueron lisadas y se inmunodetectó AKT fosforilada en Ser<sup>473</sup> o Thr<sup>308</sup>. El nivel de fosforilación de AKT se encuentra aumentado, en los residuos de Ser<sup>473</sup> y Thr<sup>308</sup>, en plaquetas estimuladas con colágeno (1 µg/mL) respecto al control; pero las incubadas con AGK2 (10 µM) no aumentan su nivel de acetilación respecto al control. La imagen es representativa de 3 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de α-tubulina como control de carga.

Para estudiar si la acetilación de AKT altera su función, se evaluó la fosforilación de la GSK-3β, sustrato de la AKT<sup>139</sup>. Como hemos visto en la Figura 4.37, al tratar las plaquetas con el AGK2, la fosforilación de AKT inducida por colágeno no se producía. En paralelo encontramos que el tratamiento con AGK2 bloqueó la fosforilación de GSK-3β, lo que sugería que la acetilación de AKT inhibía su función (Figura 4.39).



**Figura 4.39. La incubación con AGK2 disminuye el nivel de fosforilación GSK-3β.** Las mismas muestras que en el apartado anterior se utilizaron para inmunodetectar la GSK-3β fosforilada en Ser<sup>9</sup>. Se observó que la incubación con el AGK2 reduce la fosforilación de la GSK-3β en la Ser<sup>9</sup>, cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno. La imagen es representativa de 3 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de α-tubulina como control de carga.

Finalmente, hemos explorado el papel fisiológico de la acetilación de AKT en la agregación plaquetaria. Se estimularon las plaquetas con colágeno y se determinó el nivel de acetilación de AKT mediante su inmunoprecipitación. La agregación plaquetaria debida al estímulo con colágeno produjo acetilación de AKT (Figura 4.40). Este resultado apoya el papel importante de la acetilación de AKT en la función plaquetaria.



**Figura 4.40. La estimulación con colágeno provoca acetilación de AKT.** Las plaquetas en reposo o estimuladas con colágeno (1 µg/mL) fueron lisadas, posteriormente se inmunoprecipitó AKT y finalmente de inmunodetectó el nivel de acetilación AKT mediante la utilización de un anticuerpo contra las proteínas acetiladas. La agregación induce la acetilación de AKT. La imagen es representativa de 3 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de AKT control.

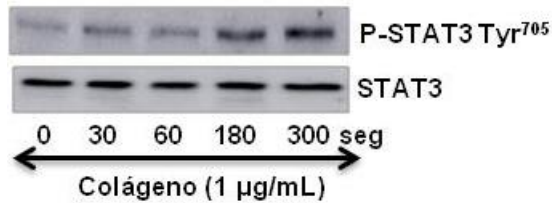
#### 4.12. La fosforilación de STAT3 en las plaquetas está mediada por la síntesis de TXA<sub>2</sub>

Varios autores han destacado la presencia, en principio inesperada, de factores de transcripción en las plaquetas, así como un papel para los mismos en sus sistemas de transmisión de señales<sup>90</sup>. Uno de ellos es el STAT3, el cual participa en la respuesta plaquetaria mediada por el colágeno, a través del receptor GPVI<sup>99</sup>. Por otra parte, también se ha descrito que STAT3 forma parte de la transmisión de señales en las plaquetas mediada por varias citocinas, como la TPO<sup>92,141</sup> o Leptina<sup>98</sup>. Todos ellos, cuando estimulan a la plaqueta, provocan la fosforilación de STAT3 y su activación. Sin embargo, desconocemos múltiples aspectos de la participación de STAT3 en los sistemas de transmisión de señales en las plaquetas.

Desde hace varias décadas es conocida la importancia de la síntesis del TXA<sub>2</sub> en la función plaquetaria, al formar parte de la amplificación de la respuesta plaquetaria<sup>142</sup>. En cambio, poco se sabe de los mecanismos de transmisión de señales implicados en esta respuesta plaquetaria. Nos planteamos por tanto estudiar la posible participación de STAT3 en la respuesta plaquetaria al TXA<sub>2</sub>, mediada por su receptor.

En primer lugar, decidimos comprobar si la fosforilación de STAT3 estaba regulada por el colágeno, como previamente se había descrito<sup>99</sup>. Se realizó un estudio cinético con distintos tiempos de agregación plaquetaria (0, 30, 60, 180, 300 seg). Pasados estos tiempos se detuvo la agregación, lisando las plaquetas con tampón RIPA; y se detectó la forma fosforilada (activa) de STAT3, empleando

un anticuerpo específico contra la Tyr<sup>705</sup>. En la cinética de la agregación plaquetaria inducida por colágeno (1 µg/mL), observamos que la fosforilación de la STAT3 aumenta de manera significativa con el tiempo (Figura 4.41). Estos resultados apoyaban la anterior publicación de Zhou *et al*<sup>69</sup>.

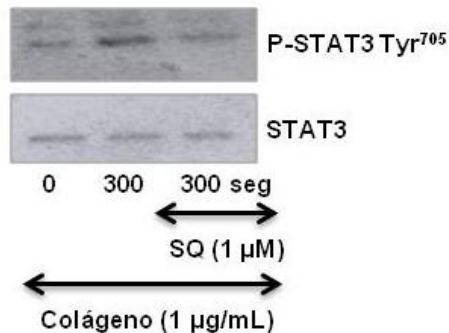


**Figura 4.41. El colágeno produce una cinética de fosforilación de STAT3.** Las plaquetas se estimularon con 1 µg/mL de colágeno a distintos tiempos de 0 a 300 seg. Pasado el tiempo de agregación, las plaquetas se lisaron con tampón RIPA y se inmunodetectó la forma fosforilada de STAT3. Se observa un aumento de la fosforilación de STAT3 con el tiempo de agregación. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

Sin embargo, sabemos que la respuesta de las plaquetas, sobre todo a concentraciones bajas de colágeno, es muy dependiente de la síntesis del TXA<sub>2</sub><sup>143</sup>. Por lo tanto, nos preguntamos si la fosforilación de STAT3 estaba directamente inducida por el colágeno o podía estar mediada por la síntesis de TXA<sub>2</sub> actuando sobre su receptor. Para comprobar esta hipótesis, decidimos tratar las plaquetas con un bloqueante del receptor del TXA<sub>2</sub>, el SQ29,548 (SQ) (1 µM).

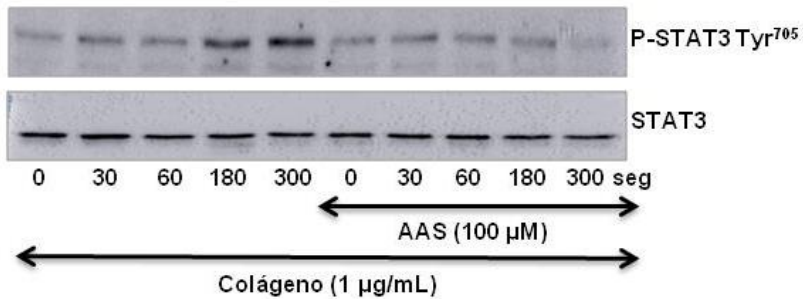
En la Figura 4.42 se observa como el bloqueante produce una disminución significativa del nivel de fosforilación de STAT3 inducido por el colágeno, sugiriendo que, al menos en parte, la fosforilación de STAT3 está mediada por la síntesis de TXA<sub>2</sub>.





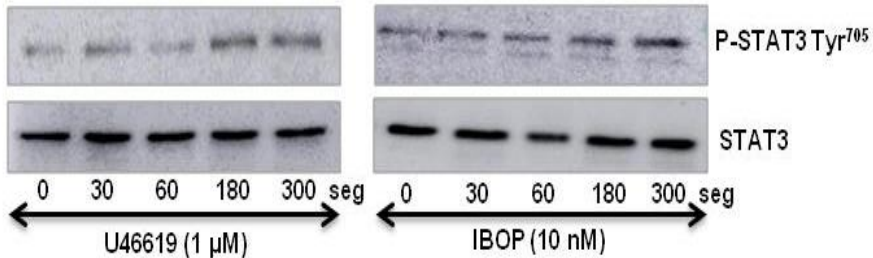
**Figura 4.42. El bloqueo del receptor del TXA<sub>2</sub> disminuye la fosforilación de STAT3 al estimular con colágeno.** Las plaquetas se incuban (10 min, a 37°C) con o sin SQ (1 µM). Seguidamente, se estimularon durante 300 seg con colágeno (1 µg/mL). Las muestras se lisaron y se inmunodetectó la fosforilación de STAT3. El SQ impidió la fosforilación del STAT3 cuando las plaquetas eran estimuladas con colágeno. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

Para poder confirmar el resultado anterior, decidimos bloquear la síntesis del TXA<sub>2</sub> mediante el empleo del AAS. Se conoce que la concentración elegida (100 µM), es suficiente para inhibir la síntesis del TXA<sub>2</sub><sup>144</sup>. En la Figura 4.43 podemos observar que el colágeno produce una cinética de fosforilación de STAT3, como ya habíamos visto, pero en las plaquetas que habían sido previamente tratadas con AAS, se impide esta fosforilación de STAT3, a cualquier tiempo de la cinética, confirmando la participación del TXA<sub>2</sub> sintetizado en la fosforilación de STAT3.



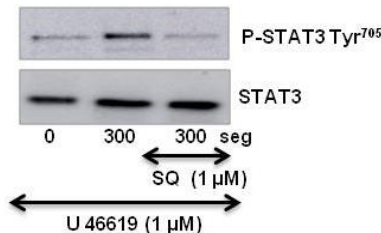
**Figura 4.43. El AAS impide la fosforilación de STAT3 al estimular con colágeno.** Las plaquetas se incuban (10 min, a 37°C) con el tampón o con AAS (100 µM) y se estimulan con colágeno (1 µg/mL). A los distintos tiempos, se lisan las plaquetas y se detecta la fosforilación de STAT3. El nivel de fosforilación de STAT3 disminuye cuando las plaquetas son tratadas con AAS 100 µM y pierden la cinética de fosforilación, que se produce cuando son estimuladas con colágeno 1 µg/mL. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad STAT3 como control de carga.

Para evaluar si el TXA<sub>2</sub> y su unión a su receptor era capaz de inducir la fosforilación de STAT3, empleamos dos análogos de esta molécula estructuralmente diferentes como son el U46619 y el IBOP. Empezamos realizando una cinética de agregación, a los mismos tiempos que se habían utilizado con el colágeno. Las dosis utilizadas fueron de 1 µM de U46619 y 10 nM de IBOP<sup>21</sup>. En la Figura 4.44 podemos observar que los dos análogos del TXA<sub>2</sub> inducen la fosforilación de STAT3 y que ésta aumenta con el tiempo de agregación.



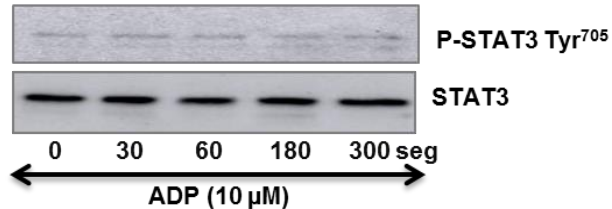
**Figura 4.44. El U46619 y el IBOP producen una cinética de fosforilación de STAT3.** Las plaquetas se estimularon con 1  $\mu\text{M}$  de U46619 y 10 nM de IBOP a distintos tiempos, desde 0 a 300 seg. A continuación, se lisaron las muestras y se inmunodetectó la forma fosforilada de STAT3. A mayor tiempo de agregación mayor nivel de fosforilación de STAT3. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

Para comprobar la especificidad de los análogos del  $\text{TXA}_2$ , bloqueamos el receptor del  $\text{TXA}_2$  con SQ. En estas condiciones, como era de esperar el U46619 no produjo agregación plaquetaria pero tampoco fue capaz de inducir la fosforilación de STAT3, demostrando la implicación del receptor del  $\text{TXA}_2$  en este proceso (Figura 4.45).



**Figura 4.45. El bloqueo del receptor del  $\text{TXA}_2$  impide la fosforilación de STAT3 al estimular con U46619.** Las plaquetas se incuban con el tampón o con SQ (1  $\mu\text{M}$ ). A los 10 min se estimularon y seguidamente se lisaron. El U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) aumenta la fosforilación de STAT3, pero el tratamiento previo con el SQ impide la fosforilación del STAT3. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

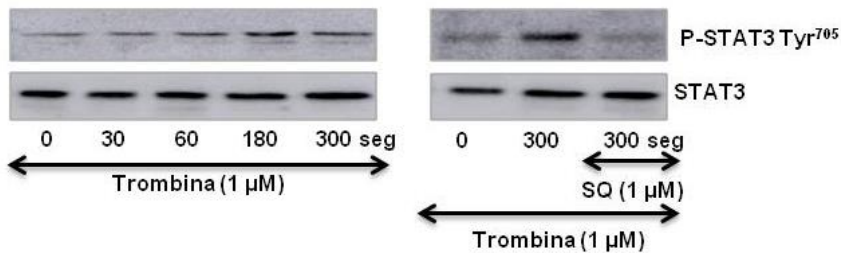
También utilizamos otros agonistas plaquetarios y comprobamos si eran capaces de producir la fosforilación de STAT3 por ellos mismos o eran dependientes de la síntesis del TXA<sub>2</sub>. En esta ocasión utilizamos el ADP a una concentración de 10 μM, agonista que no es dependiente del TXA<sub>2</sub> en la amplificación de la respuesta plaquetaria<sup>145</sup>. El resultado que obtuvimos es que la fosforilación de STAT3 no varía con la cinética de agregación al ADP (Figura 4.46). Por lo tanto, todos estos resultados apoyan el concepto de que la fosforilación de STAT3 sí que es dependiente de la síntesis de TXA<sub>2</sub>.



**Figura 4.46. El ADP no produce una cinética de fosforilación de STAT3.**

Las plaquetas se estimularon con 10 μM de ADP a distintos tiempos, desde 0 a 300 seg. A continuación, se lisaron las muestras y se inmunodetectó la forma fosforilada de STAT3. La agregación plaquetaria no produce cambios en el nivel de fosforilación de STAT3. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

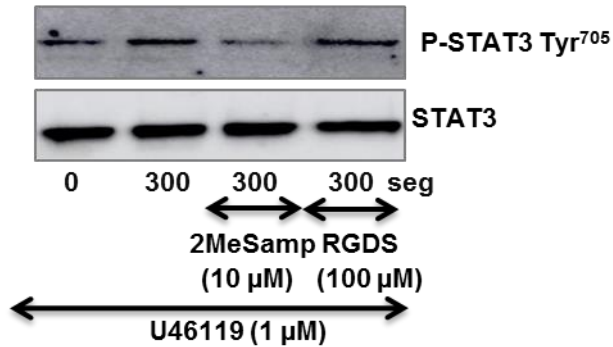
Otro agonista que utilizamos fue la trombina (1 U/ml) que sí que es parcialmente dependiente de la síntesis de TXA<sub>2</sub><sup>146</sup>. Repetimos el mismo experimento de la cinética de agregación y observamos que la trombina era capaz de producir la fosforilación de STAT3 al utilizar el SQ se produjo la reversión de esta fosforilación (Figura 4.47). Estos resultados confirman que la fosforilación de STAT3 es, al menos en parte, dependiente de la síntesis del TXA<sub>2</sub>.



**Figura 4.47. La trombina produce una cinética de fosforilación de STAT3 que se revierte con el SQ.** La cinética de agregación de las plaquetas con trombina (1  $\mu\text{M}$ ) produjo la fosforilada de STAT3, pero el SQ (1  $\mu\text{M}$ ) disminuyó la fosforilación a una intensidad similar al tiempo 0 de la agregación. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

Dado los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos estudiar la participación de las vías de amplificación de la agregación plaquetaria inducida por el  $\text{TXA}_2$ , como es la liberación de los nucleótidos de ADP y la agregación mediada por la activación de la  $\text{Gp } \alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ .

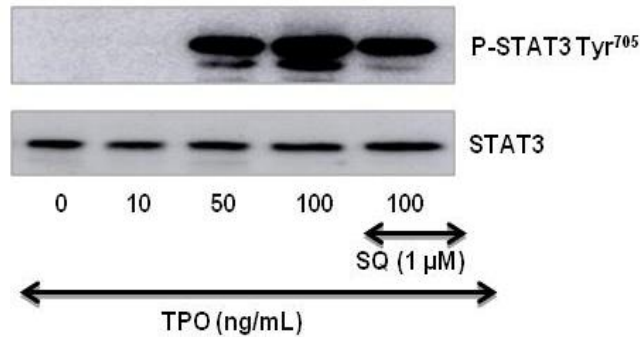
En esta ocasión utilizamos dos inhibidores distintos: el 2MeSAMP que bloquea el receptor del ADP,  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$  y el RGDS que impide la agregación plaquetaria mediada por  $\text{Gp } \alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . En la Figura 4.48 se observó como la fosforilación de STAT3 inducida por el U46619 disminuye parcialmente con el bloqueo de  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$ , pero no de la agregación, sugiriendo que la fosforilación de STAT3 es independiente de la agregación plaquetaria pero dependiente de la liberación de ADP.



**Figura 4.48. El 2MeSamp impide la fosforilación de STAT3 inducida por el U46619, en cambio el RGDS no bloquea la fosforilación.** El 2MeSamp (10  $\mu\text{M}$ ) disminuye la fosforilación de STAT3 inducida por el U46619 (1  $\mu\text{M}$ ), en cambio el RGDS (100  $\mu\text{M}$ ) no produce alteración de la fosforilación. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

Como ya se ha comentado previamente, STAT3 participa en la transmisión de señales inducida por el TPO, tanto en plaquetas como en megacariocitos<sup>92</sup>. Nos preguntamos si también la fosforilación de STAT3 inducida por el TPO podía estar mediada por la síntesis de TXA<sub>2</sub>. Para ello empleamos el Romiplostin (Romiplostin, Amge Europe, Breda, Holanda), análogo del TPO, y estudiamos qué ocurría con el nivel de fosforilación de STAT3 si previamente al estímulo con TPO bloqueábamos el receptor del TXA<sub>2</sub>. Decidimos, por una parte, realizar agregaciones con concentraciones crecientes de TPO (0, 10, 50 y 100 ng/mL). Por otra parte, se repitió la agregación de más concentración de TPO (100 ng/mL), pero tratando previamente la muestra con el SQ (1  $\mu\text{M}$ ). En la Figura 4.49 se observa como el TPO produce la fosforilación de STAT3 de manera dosis dependiente y con un aumento mayor que cualquiera de los agonistas utilizados. Con respecto a la muestra que había sido tratada con el SQ, se produce una disminución parcial de la fosforilación, sugiriendo que al menos en parte la fosforilación de

STAT3 inducida por TPO está también mediada por la síntesis de TXA<sub>2</sub>.



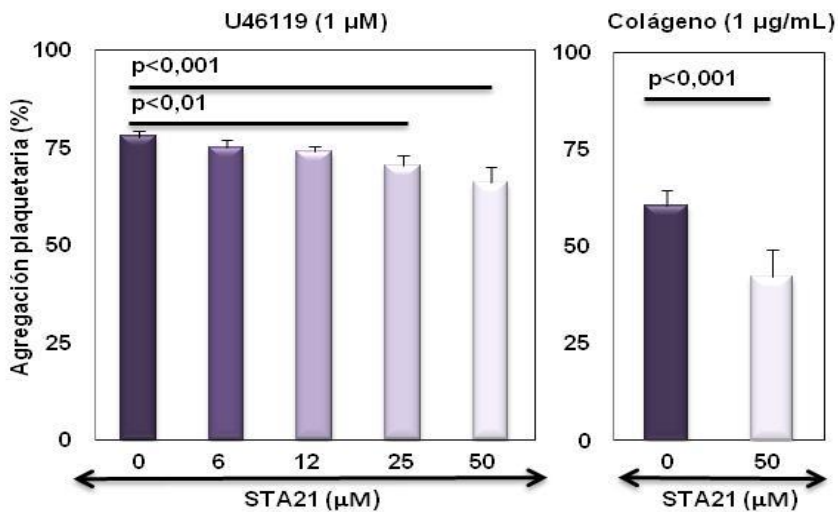
**Figura 4.49. El TPO fosforila de STAT3 de forma dosis dependiente y SQ bloquea parcialmente su fosforilación.** Las plaquetas se estimularon con dosis crecientes de TPO (0, 10, 50 y 100 ng/mL). El mismo proceso, se repitió, pero tratando previamente con SQ (1  $\mu$ M) a la muestra que se estimuló con el TPO más concentrado. A los 5 min se lisaron y se inmunodetectó la forma fosforilada de STAT3. Se observa como el TPO provoca la fosforilación de STAT3, siendo mayor, cuando la concentración era más alta. Pero, el SQ bloquea esta fosforilación, aunque no la revierte. La imagen es representativa de al menos 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad total de STAT3 como control de carga.

#### 4.13. Implicaciones funcionales de la inhibición de STAT3

Por los resultados obtenidos hasta el momento, parece ser que la fosforilación de STAT3 es importante en el mecanismo de transmisión de señales mediado por el receptor del TXA<sub>2</sub>, pero ¿tiene algún tipo de implicación en la función plaquetaria? Una manera de dar respuesta fue mediante la utilización de un inhibidor específico del STAT3, el STA21. Esta molécula no permite la dimerización del STAT3 impidiendo, de esa manera, su fosforilación y activación<sup>99</sup>.

#### 4.13.1. La regulación de la agregación plaquetaria por STA21

En primer lugar, se estudió la agregación, mediante la utilización de plaquetas que habían sido previamente incubadas durante 10 minutos a 37° con el STA21, a distintas dosis (0, 6, 12, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Para inducir la agregación plaquetaria se utilizaron dos agonistas, en esta ocasión fueron: U46619 1  $\mu\text{M}$  y colágeno 1  $\mu\text{g/mL}$ . En la Figura 4.50 se observa, cómo con las dosis más altas de STA21, se produce una inhibición significativa de la agregación plaquetaria al estimular con U46619. Lo mismo ocurre con el colágeno, como ya habían comentado otros autores<sup>99</sup>.

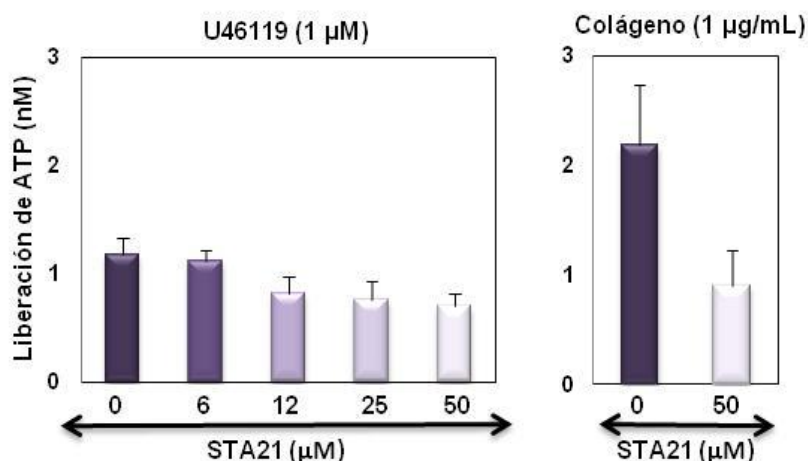


**Figura 4.50 El efecto del STA21 sobre la agregación plaquetaria.** Las plaquetas se incuban (10 min, 37°C) con las dosis indicadas de STA21. A los 10 min se estimulan con U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) o colágeno (1  $\mu\text{g/mL}$ ), se registra la agregación durante 5 min y se evalúa el porcentaje de agregación máxima. El STA21 provoca una inhibición dosis dependiente de la agregación cuando las plaquetas son estimuladas con U46619 y colágeno. La imagen es representativa de al menos 10 experimentos diferentes.



#### 4.13.2. La regulación de la liberación de gránulos densos por el STA21

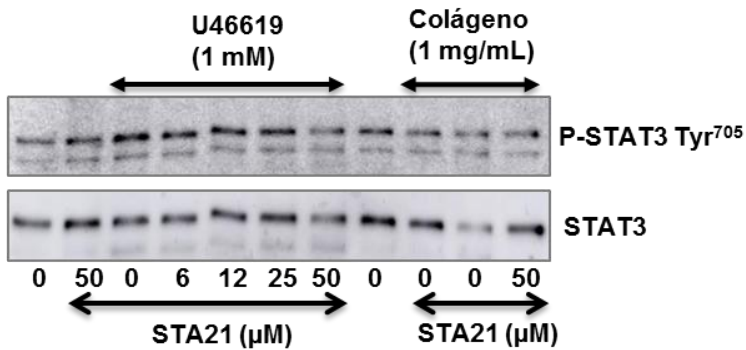
El siguiente paso fue estudiar si el STA21 regulaba la secreción de gránulos densos. En la Figura 4.51 se observa que al incubar las plaquetas con dosis crecientes de STA21 se producía una reducción significativa de la liberación de ATP en plaquetas estimuladas con U46619. Esta inhibición se producía a dosis más bajas de STA21 que la inhibición de la agregación. Resultados parecidos se obtuvieron con el colágeno (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figura 4.51. El efecto del STA21 sobre la liberación de gránulos densos.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con el inhibidor el STAT1 (0, 6, 12, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ), y se estimulan con U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) o colágeno (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se registra la liberación durante 5 min. El STA21 provoca una inhibición significativa de la liberación cuando las plaquetas son estimuladas con U46619 y colágeno. La imagen es representativa de al menos 10 experimentos diferentes.

En paralelo a los experimentos de agregación plaquetaria y liberación, se estudió qué ocurría con el nivel de fosforilación del STAT3 al estimular las plaquetas con U46619 o colágeno y en presencia del inhibidor de STAT3, el STA21. Encontramos que la

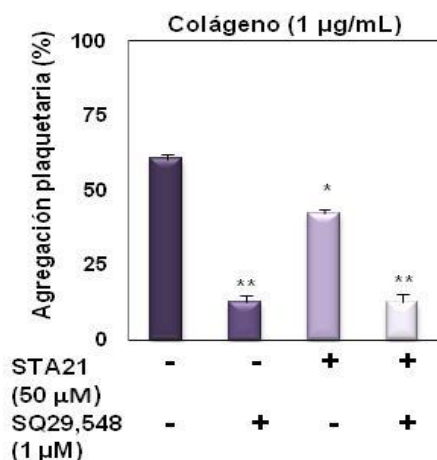
fosforilación de STAT3 se comportaba en paralelo con la función plaquetaria, es decir, que cuando se inhibe la agregación debido a la presencia del inhibidor, se produce una disminución de la fosforilación de STAT3 (Figura 4.52).



**Figura 4.52. Efecto del STA21 en la fosforilación de la STAT3 en plaquetas estimuladas con distintos agonistas.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con el STA21 (0, 6, 12, 25 y 50 μM), y se estimulan con U46619 (1 μM) o con colágeno (1 μg/mL). A los 5 min se lisan las plaquetas y se detecta la fosforilación de STAT3. Los agonistas provocan un aumento del nivel de fosforilación de STAT3 con respecto al control, en cambio el STA21 provoca una disminución. A más concentración del inhibidor menor nivel de fosforilación. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de STAT3 como control de carga.

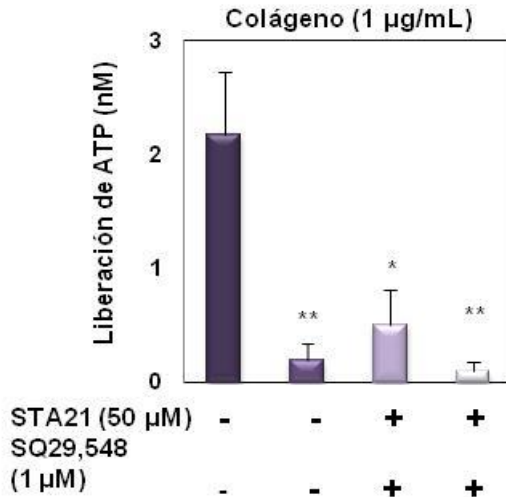
Para finalizar el estudio de la fosforilación de STAT3 mediada por el TXA<sub>2</sub>, se decidió repetir el estudio de agregación plaquetaria y liberación de gránulos, pero en esta ocasión, se utilizaron de manera simultánea los dos inhibidores, el STA21 y el SQ. En primer lugar, se incubaron plaquetas lavadas con distintas combinaciones, es decir, unas plaquetas control, otras con 50 μM de STA21, otras con 1 μM de SQ, y la combinación de ambos inhibidores. Pasados los 10 minutos de incubación se estimularon las distintas muestras con 1 μg/mL de colágeno. En la Figura 4.53 se puede observar cómo la agregación plaquetaria disminuye de manera significativa con ambos

inhibidores, tanto combinados como por separado. Además, no se observa efecto acumulativo de inhibición sobre la agregación al colágeno, cuando se utilizan ambos inhibidores simultáneamente.



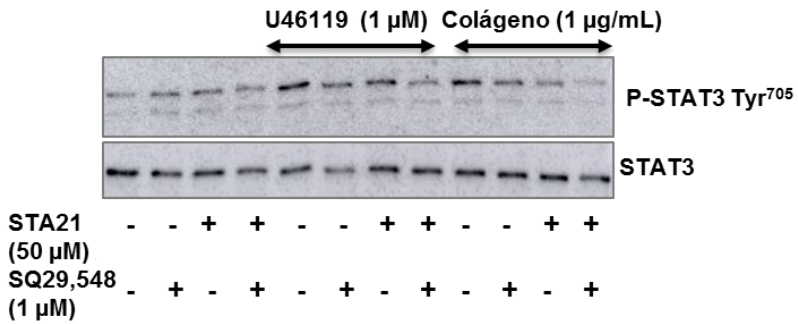
**Figura 4.53. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la agregación plaquetaria.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con los inhibidores STA21 (50 µM) y SQ (1 µM) (- ausencia, + presencia), y se estimulan con colágeno (1 µg/mL). Se registra la agregación durante 5 min y se mide el porcentaje de agregación. El STA21 y el SQ provocan una inhibición significativa de la agregación cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno. n=5, \*p<0,001; \*\*p=0.000.

Con respecto a la liberación de gránulos densos, los resultados obtenidos van en paralelo a la agregación, es decir, ambos inhibidores (STA21 y SQ) producen una disminución significativa de la liberación. Cuando se combinan ambos inhibidores no se observa un efecto acumulativo (Figura 4.54). Todos juntos, estos resultados sugieren que el TXA<sub>2</sub> es el responsable de la fosforilación de STAT3 inducida por colágeno.



**Figura 4.54. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la liberación plaquetaria.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a  $37^{\circ}\text{C}$ ) con los inhibidores STA21 (50  $\mu\text{M}$ ) y SQ (1  $\mu\text{M}$ ) (- ausencia, + presencia), y se estimulan con colágeno (1  $\mu\text{g/mL}$ ). Se registra la liberación durante 5 min y se evalúa la liberación de ATP. El STA21 y el SQ provocan una inhibición significativa de la agregación cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno. N=5

Como en el apartado anterior decidimos ver cómo eran los niveles de fosforilación de STAT3, cuando las plaquetas eran tratadas juntamente con el inhibidor específico de STAT3 (STA21) y el inhibidor de receptor del  $\text{TXA}_2$ . Se repitieron las mismas agregaciones en las que se había evaluado el porcentaje de inhibición causada por los inhibidores, pero en esta ocasión se lisaron las plaquetas con tampón RIPA y se inmunodetectó la forma fosforilada de STAT3 mediante el uso de un anticuerpo específico. En la Figura 4.55 podemos observar que ambos inhibidores el SQ y el STA21, producen una disminución del nivel de fosforilación de STAT3, tanto si se estimula con U46619 como con colágeno, produciéndose un sinergismo entre los dos inhibidores.



**Figura 4.55. El efecto conjunto del STA21 y el SQ sobre la fosforilación de STAT3.** Las plaquetas se incubaron (10 min, a 37°C) con los inhibidores STA21 (50 μM) y SQ (1 μM) (- ausencia, + presencia), y se estimulan con U46619 (1 μM) o con colágeno (1 μg/mL). La agregación se detiene a los 5 min con tampón Ripa y se detectó la forma fosforilada de STAT3. Al incubarse con el STA21 y el SQ29,548 disminuyó significativamente el nivel de fosforilación de STAT3 con respecto a la muestra sin inhibidor, cuando las plaquetas eran estimuladas con cualquiera de los dos agonistas, habiendo una disminución mayor cuando se unieron los dos inhibidores. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes. En la parte inferior se muestra la cantidad de STAT3 como control de carga.



## 5. DISCUSIÓN





## 5. DISCUSIÓN

La regulación de la función plaquetaria mediada por los procesos de acetilación/deacetilación de proteínas, así como la inesperada participación de los factores de transcripción en los sistemas de transmisión de señales de las plaquetas humanas son aspectos poco o nada conocidos de control de las respuestas de las plaquetas. Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran por primera vez que la acetilación/deacetilación enzimática de proteínas no histonas juega un papel importante en distintos aspectos de la regulación de la función plaquetaria. Las enzimas reguladoras de la deacetilación, HDAC clásicas y las sirtuinas participan de manera activa en la agregación plaquetaria, la liberación de gránulos densos, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  y la síntesis de  $\text{TXA}_2$ . Estas respuestas plaquetarias están especialmente reguladas por la acción de dos enzimas, la HDAC6 y la SIRT2, aunque no se puede descartar la participación de otras HDAC clásicas o sirtuinas. Por otra parte, nuestros resultados indican que la fosforilación de STAT3 inducida por el colágeno, está en realidad mediada en gran parte por la amplificación de la síntesis de  $\text{TXA}_2$ , actuando sobre su propio receptor.

La acetilación de las histonas es una modificación postraduccional que se conoce desde hace más de 50 años, sobre todo por su papel en el núcleo, donde está bien establecida su participación como mecanismo de regulación de la expresión génica<sup>147</sup>. No fue hasta el año 2009, cuando apareció un trabajo germinal de Choudhary *et al.*<sup>68</sup> en el que se demuestra mediante un

enfoque proteómico que la acetilación de proteínas es un fenómeno mucho más extendido de lo conocido, y con funciones más allá del núcleo, es decir, en el citoplasma, donde tiene importantes implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas<sup>148</sup>. De hecho, se ha llegado a sugerir que la acetilación/deacetilación de las proteínas histonas y no histonas constituye un mecanismo de modificación postraduccional comparable al de la fosforilación en cuanto a complejidad e implicaciones funcionales<sup>75</sup>. Este descubrimiento ha dado lugar a la aparición del término “acetiloma”<sup>68</sup>, que incluiría el conjunto de proteínas acetiladas (o acetilables) y que se considera que podría llegar a tener una importancia y complejidad semejante al de la fosforilación de Ser y Thr en diferentes proteínas celulares<sup>149</sup>. Sin embargo, y con la evidente excepción de la acetilación no enzimática de la COX-1 por el AAS, la acetilación enzimática de proteínas en las plaquetas como mecanismo de transmisión de señales no había sido previamente explorada.

Por todo ello, el primer objetivo que se planteó en esta Tesis era estudiar si en plaquetas humanas existían proteínas acetiladas en Lys<sup>150,151</sup>. En los resultados obtenidos se ha demostrado la existencia de un patrón de proteínas acetiladas en plaquetas humanas en reposo (Figura 4.1) que se altera al inducir la agregación plaquetaria en presencia de colágeno (Figura 4.2), pero también con otros agonistas plaquetarios (no se muestra). Por lo tanto, en células anucleadas como las plaquetas, también se producen procesos de acetilación/deacetilación. Recientemente ha aparecido un estudio proteómico en el que se han identificado unos 552 sitios de acetilación distintos en 273 proteínas plaquetarias<sup>152</sup>. Esta observación apoya nuestro resultado de que en plaquetas existe un

patrón característico de proteínas acetiladas. Además, estos resultados sugieren que el proceso de acetilación/deacetilación en las plaquetas debe ser importante y plantea la posibilidad de pensar en la existencia de un acetiloma plaquetario comparable al fosfosoma, tan importante para la función plaquetaria<sup>36,39</sup>. Este acetiloma plaquetario incluye proteínas implicadas en el metabolismo, proteínas del citoesqueleto, proteínas que forman parte de los mecanismos de transmisión de señales, e incluso proteínas que participan en la liberación de los gránulos<sup>152</sup>.

Nos planteamos entonces estudiar los mecanismos que regulan la acetilación/deacetilación de proteínas en las plaquetas. Para ello, utilizamos un inhibidor de las HDCA como es el TSA<sup>85</sup>. Los resultados revelaron que la incubación de las plaquetas en reposo con el TSA producía un aumento considerable de la acetilación de una proteína de un tamaño aproximado de 50 kDa (Figura 4.3). Posteriormente, y mediante el empleo de la microscopia confocal e inmunodetección, se identificó a la proteína como la  $\alpha$ -tubulina en su forma acetilada (Figura 4.4). Los resultados de microscopia mostraron que en plaquetas en reposo la  $\alpha$ -tubulina, al menos en parte, se encuentra parcialmente acetilada formando un anillo bajo la membrana citoplasmática de la plaqueta (Figura 4.5).

Este resultado confirmaba un estudio previo que demostraba cómo la acetilación del aminoácido Lys<sup>40</sup> de la  $\alpha$ -tubulina favorece la estabilización del microtúbulo, permitiendo a las células mantener su forma<sup>153,154</sup>. En condiciones normales las plaquetas circulan en forma de disco; cuando se adhieren y activan sufren un drástico cambio de forma, con extensión de pseudópodos, aumentando su tamaño de manera significativa. En este proceso, la reorganización de las

proteínas del citoesqueleto y de la estructura de microtúbulos, juegan un papel muy importante. Una proteína clave es la  $\alpha$ -tubulina, la cual tiene la capacidad de polimerizarse formando largas fibras que contribuyen a la emisión de pseudópodos durante la activación plaquetaria<sup>155,156</sup>.

Por ello, decidimos continuar estudiando la implicación de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en una respuesta plaquetaria muy importante, como es la agregación. Observamos que, con la agregación plaquetaria a diferentes agonistas plaquetarios, se produce una deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina (Figura 4.10), confirmando un resultado que había sido ya descrito previamente por Sadoul *et al*<sup>125</sup>. Pero fuimos un paso más allá y quisimos demostrar si este proceso era dependiente de la agregación mediada por la Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , para lo cual bloqueamos la agregación empleando RGDS. En estas condiciones encontramos que la activación con agonistas no inducía la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en ausencia de agregación (Figura 4.11). Este resultado sugiere que la señalización “fuera-dentro”, a través de receptor de la integrina Gp  $\alpha_{IIb}\beta_3$ <sup>126</sup>, es clave en el proceso regulador de la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina.

El siguiente paso que nos planteamos era averiguar qué enzima era la responsable de la acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas. En distintos tipos celulares, se había demostrado ampliamente que la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina era dependiente de HDAC6 y de la SIRT2<sup>157</sup>. En cambio, poco se sabe sobre las acetiltransferasas responsables de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Sadoul *et al.* describieron la presencia de la HDAC6 en las plaquetas y su participación en la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina<sup>125</sup>, observación que se confirma en esta Tesis al comprobar de nuevo

que HDAC6 está presente en las plaquetas (Figura 4.7) y que su inhibición es responsable del incremento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina.

Inesperadamente, y a pesar de la disminución del nivel de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en el lisado celular de plaquetas agregadas (Figura 4.6), se observó un aumento en la presencia de la  $\alpha$ -tubulina acetilada en el citoesqueleto cuando las plaquetas se agregaban con colágeno (Figura 4.8). La diferencia en la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en el lisado celular completo y el citoesqueleto sugiere que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina podría desempeñar un papel importante en la reorganización del citoesqueleto. Además, también se encontró que la HDAC6, de manera similar a la  $\alpha$ -tubulina, se incorpora al citoesqueleto reorganizado inducido por el agonista (Figura 4.9). Mediante este proceso, la HDAC6 estaría en una posición donde podría ejercer su actividad en la regulación de la reorganización del citoesqueleto. Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar los efectos reguladores de la HDAC6 sobre la reorganización del citoesqueleto ya que resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que son muchas las proteínas acetiladas que se incorporan al citoesqueleto durante la agregación plaquetaria (no se muestra).

Al examinar las implicaciones funcionales de la inhibición de la HDAC6 y la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina, en la agregación plaquetaria, la secreción de gránulos y los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$ , (estudio que no se había realizado previamente por Sadoul *et al*<sup>125</sup>), se encontró que la incubación de las plaquetas con el TSA reducía parcialmente las respuestas plaquetarias inducidas por colágeno y U46619 (Figura 4.12, 4.15 y 4.17). Cabe destacar que la inhibición de

la función plaquetaria por el TSA se correlaciona con el incremento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina que impide la activación plaquetaria (Figura 4.16). Estos resultados apoyan la asociación entre la agregación plaquetaria y la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina. En conjunto, los datos sugieren que la inhibición de las HDCA por el TSA puede constituir un nuevo mecanismo regulador de varios aspectos de la función plaquetaria, muy probablemente relacionados con el efecto del TSA sobre la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina, aunque no podemos descartar que se esté produciendo también la acetilación de otras proteínas substratos de la HDAC6.

Para poder confirmar la responsabilidad de la HDAC6 en la inhibición plaquetaria inducida por la TSA, se incubaron las plaquetas con TBA, inhibidor específico de la HDAC6. Se obtuvieron resultados semejantes tanto en la función plaquetaria (Figura 4.18) como en la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina (Figura 4.19) a los obtenidos con el TSA, lo que confirmaría el papel principal de HDAC6 en la regulación de la función plaquetaria entre las distintas HDAC.

Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar los mecanismos por los que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina regula las distintas respuestas funcionales de las plaquetas. Existen estudios en los que se ha demostrado que la polimerización de la  $\alpha$ -tubulina regula el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma<sup>25</sup> y que también regula la liberación de gránulos<sup>158</sup>, aunque se desconoce cómo la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina puede participar en estos procesos. Además se ha demostrado que la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina es un requisito previo para la polimerización de la  $\alpha$ -tubulina, proceso vinculado a la formación de contactos de adhesión en los fibroblastos<sup>121</sup>. Por lo tanto, estos primeros resultados, estaban en concordancia con los ya

publicados por Sadoul *et al.*<sup>125</sup>, quien estudia cómo la adhesión plaquetaria está regulada por la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina.

Un estudio reciente realizado por Aslan *et al.*<sup>159</sup>, demostró la importancia de la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en la reorganización del citoesqueleto en plaquetas cuando son estimuladas con CRP y la participación de la HDAC6 en este proceso. En esta Tesis se confirman estos resultados y se amplía el papel de las HDAC6 en plaquetas estimuladas con el análogo del TXA<sub>2</sub>. Por lo tanto, el aumento de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas, debido a la inhibición de las HDAC, podría reducir la polimerización de la  $\alpha$ -tubulina en presencia de agonistas fisiológicos, lo que podría afectar a la reorganización del citoesqueleto, los movimientos de Ca<sup>2+</sup> y la liberación de gránulos, reduciendo de forma parcial la agregación plaquetaria. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar este posible mecanismo de regulación de la reactividad plaquetaria, lo que podría constituir eventualmente una nueva diana farmacológica antitrombótica.

Los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto están implicados en una gran variedad de procesos celulares como el transporte intracelular, la formación de huso mitótico, el mantenimiento de la forma celular, la migración celular y la transmisión de señales<sup>160</sup>. La  $\alpha$ -tubulina forma parte de microtúbulos y, actualmente, ya se conocen varias implicaciones funcionales de la acetilación del aminoácido Lys<sup>40</sup> de la  $\alpha$ -tubulina. Debemos tener en cuenta que esta modificación postraducciona, tiene como principal función favorecer la estabilización de los microtúbulos, permitiendo a las células mantener su forma<sup>153,161</sup>. Esta función de la  $\alpha$ -tubulina está relacionada con diversas patologías, como puede ser el cáncer,

patologías neuronales, enfermedad cardíaca, inflamación e infecciones víricas y las alteraciones con el nivel de acetilación de la Lys<sup>40</sup> de la  $\alpha$ -tubulina<sup>162</sup>. Este hecho ha dado lugar a la aparición de muchos estudios en contextos muy diferentes como es la inmunología o la plasticidad neuronal<sup>163</sup>. Sin embargo, el conocimiento preciso de la función molecular de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina aún se está investigando.

Con respecto a las plaquetas y la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina<sup>125</sup>, es durante la cascada de activación plaquetaria cuando se induce la reorganización del citoesqueleto y el cambio de forma, cuando se produce una deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina<sup>159</sup>. Hecho que también se observa en los resultados de esta Tesis y, por lo tanto, en concordancia con los resultados de Sadoul *et al.* y Aslan *et al.* Tenemos que tener en cuenta que para que este proceso se lleve a cabo, se requiere de la participación de una deacetilasa, como es la HDAC6, que permite producir estos cambios dinámicos en la acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina.

Esta modificación postraduccional de la  $\alpha$ -tubulina en la reorganización del citoesqueleto plaquetar, apunta a un papel regulador en la función plaquetaria, ya que muchas de las repuestas plaquetarias dependen de la reorganización del citoesqueleto, como el transporte vesicular, la exocitosis, la adhesión o la propia agregación<sup>164</sup>. Todos estos procesos, en parte, están regulados por modificaciones postraduccionales reversibles, aunque en las plaquetas el proceso más estudiado es la fosforilación de proteínas<sup>40</sup> y no la acetilación. Pero con los resultados de esta Tesis, se abre un nuevo e interesante campo de estudio.



La investigación en este área es de particular importancia porque existen diversos inhibidores de la HDAC6 que están aprobados como agentes terapéuticos o están en proceso de ensayo clínico, con la finalidad de ser utilizarlos como terapias contra el cáncer o terapias autoinmunes<sup>165</sup>. Respecto al uso de los inhibidores de las HDAC como agentes anticancerígenos, la FDA ha aprobado dos, el vorinostat y el desipetide. Sin embargo, los mecanismos moleculares todavía no están bien establecidos y menos todavía con respecto a las plaquetas, aunque sí que está demostrado que el vorinostat puede producir trombopenia<sup>166,167</sup>. Una posible explicación de este efecto secundario podría estar relacionada con la acción del vorinostat sobre el megacariocito, afectando la formación de nuevas plaquetas, proceso regulado por la acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina<sup>63</sup>. Pero no solo eso, se debería estudiar también cómo serían esas plaquetas funcionalmente, ya que como hemos visto en esta Tesis, es muy probable que este fármaco también afecte a la función plaquetaria, al inhibir la HDAC6 de las plaquetas circulantes<sup>168</sup>.

En esta Tesis se ha estudiado mucho la acetilación y su control por las deacetilasas, pero no se ha tratado el efecto o el posible papel de la acetilasas y su acción sobre las plaquetas. Recientes estudios han demostrado la presencia de la acetilasa p300 en las plaquetas<sup>152,169</sup>. Esta enzima podría ser al menos en parte la responsable de la acetilación de las proteínas plaquetarias, ya que la p300 se activa en las plaquetas cuando éstas son estimuladas por colágeno<sup>152</sup>. En otros tipos celulares como las células migratorias del cáncer de ovario, se conoce que la p300 es capaz de acetilar proteínas reguladoras de la movilidad, como la actina y la cortactina,

facilitando la tumorigénesis<sup>170</sup>. Con respecto a las plaquetas se ha observado que al estimularlas con CRP se produce la acetilación de cortactina, proceso que se bloquea al utilizar un inhibidor de la p300, como es el C646. Además, otros sustratos de la p300 pueden ser acetilados como es el STAT3<sup>171</sup> y regular de esta manera su actividad. En nuestro laboratorio hemos realizado estudios preliminares de la acetilación de STAT3 en respuesta a diferentes agonistas plaquetarios. Aunque no hemos logrado establecer un patrón claro de acetilación de STAT3 frente a un agonista, probablemente tenga una cinética de acetilación/deacetilación con el tiempo de agregación, aunque son necesarios más estudios para confirmar este punto. Actualmente estamos estudiando más esta modificación y vamos a empezar a utilizar el inhibidor de la p300 con la finalidad de observar algún cambio en el nivel de acetilación de STAT3 y su posible relación con las distintas respuestas plaquetarias.

Tanto la inhibición de las HDAC como de las HAT reducen la función plaquetaria, algo aparentemente contradictorio. Ejemplos de la inhibición de las HDAC y su acción sobre la función plaquetar se pueden ver claramente en esta Tesis. Con respecto a la inhibición de la HAT, Aslan *et al* estudió cómo el C646, inhibidor de la p300, produce una inhibición significativa de la agregación plaquetaria al CRP<sup>152</sup>. Hay varias explicaciones plausibles. En primer lugar, las HAT y las HDAC/sirtuinas son diferentes y en algunos casos la acetilación del aminocido Lys puede actuar como activador de la enzima, mientras que en otros podría actuar como inhibidor. En segundo lugar, las proteínas pueden presentar varios sitios de acetilación, según las condiciones, favoreciendo o inhibiendo su

función. En tercer lugar, diferentes HAT y HDAC/sirtuinas podrían actuar sobre la misma proteína, pero en diferentes residuos de Lys. Finalmente, la cinética de acetilación, así como la de fosforilación u otras modificaciones postraduccionales de las proteínas podrían ser importantes en la integración de diferentes respuestas. Por tanto, es evidente que todavía hay mucho margen para la investigación en este campo.

Desde hace mucho tiempo se conoce que en las plaquetas se produce un proceso muy importante regulado por acetilación, la acetilación de la COX-1 por el AAS, el antiagregante más utilizado para el tratamiento de síndrome coronario agudo (SCA). El AAS acetila de forma irreversible a una Ser que se encuentra en el centro activo de la enzima COX-1, impidiendo el acceso del AA a la enzima, y por tanto bloqueando la síntesis de TXA<sub>2</sub><sup>73</sup>.

Sin embargo, son varias las diferencias entre este proceso de acetilación inducido por el AAS y las acetilaciones objeto de la presente tesis: 1) el proceso de acetilación de COX-1 por el AAS es irreversible, permaneciendo, por tanto, durante toda la vida de la plaqueta; 2) es un proceso no regulado por enzimas<sup>74</sup>, como las HDAC o las HAT, enzimas que son uno de los objetivos principales de estudio de esta Tesis; 3) la acetilación de COX-1 por el AAS se produce en el aminoácido Ser, no en Lys.

En cambio, en los resultados de esta Tesis hemos visto que el AAS es capaz de aumentar también el nivel de acetilación de distintas proteínas plaquetarias, acetilando, entre otras, a la  $\alpha$ -tubulina (Figura 4.22). Este resultado abre un nuevo campo de acción del AAS sobre las plaquetas, al ser capaz de acetilar

diferentes proteínas (Figura 4.21), no solo a la COX-1 sino que también a los residuos de las Lys de diferentes proteínas plaquetarias, aunque todavía no se sabe cuáles son muchas de ellas, ni las posibles implicaciones funcionales de muchas de estas acetilaciones.

Diversos autores han demostrado la capacidad que tiene el AAS de acetilar otras proteínas, como el fibrinógeno<sup>172</sup> o la p-53<sup>132</sup>. El papel funcional de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina inducida por el AAS es difícil de analizar porque las plaquetas son sensibles a la inhibición del TXA<sub>2</sub> por el AAS. Aunque el hecho de que el AAS sea capaz de acetilar a la  $\alpha$ -tubulina y, de esta manera, regular su polimerización podría ayudar a esclarecer los efectos COX-1 independientes del AAS sobre la plaqueta. Curiosamente, el AAS se ha sugerido en varias ocasiones para el tratamiento y la prevención del cáncer<sup>173</sup>, aunque no está claro si este efecto es dependiente de la síntesis del TXA<sub>2</sub>. Además, el AAS y los inhibidores de HDAC han demostrado que actúan de forma sinérgica sobre varios sustratos, incluida la eNOS<sup>174</sup>.

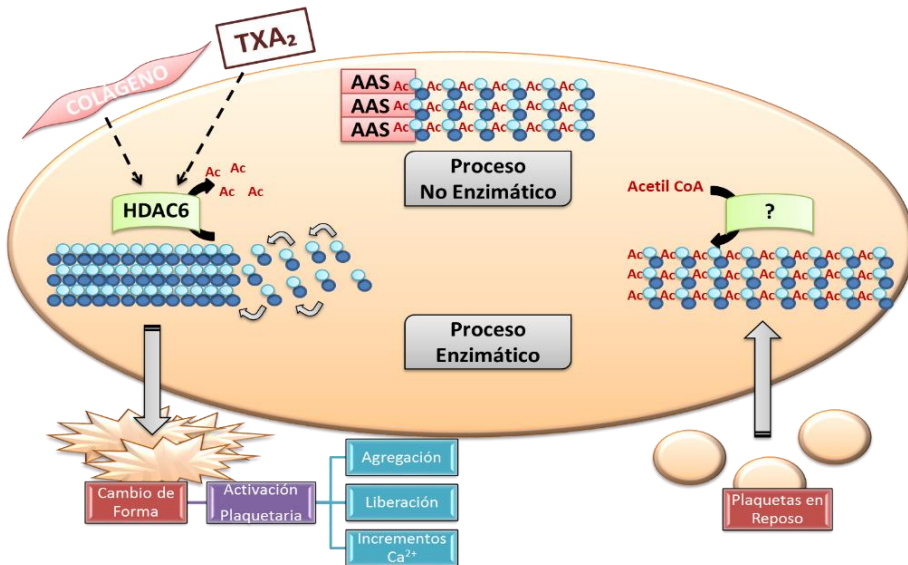
Como ya se ha comentado el AAS es el antiagregante más utilizado para el tratamiento del SCA, patología que causa un alto grado de morbilidad y mortalidad, sobre todo en pacientes con diabetes<sup>13</sup>. En este sentido, diversos estudios han demostrado que los pacientes diabéticos presentan una función plaquetaria aumentada y una menor respuesta al AAS<sup>175</sup>.

Varias son los argumentos que podrían justificar esta hiperfunción plaquetaria relacionada con la diabetes, como una mayor reactividad plaquetaria, una aceleración del recambio

plaquetario, el aumento del estrés oxidativo, etc. Pero, con los resultados que hemos obtenidos en esta Tesis, donde el AAS es capaz de acetilar muchas proteínas, más allá de la COX-1, nos permiten hipotetizar sobre otras posibles explicaciones, ya que existe un estudio in vitro donde se demuestra que altos niveles de glucosa dificulta la acetilación de la Ser<sup>529</sup> en la COX-1<sup>176</sup>, pero también de muchos otros residuos de Ser de otras proteínas muy diversas como la P-selectina<sup>177</sup>.

Por lo tanto, la acetilación de proteínas en Lys por parte del AAS y que los pacientes diabéticos con AAS presenten menos nivel de acetilación, podría explicar algunos de los efectos COX-1 independientes del AAS en diabéticos. Esta relación entre diabetes, acetilación de proteínas plaquetarias y efecto del AAS puede resultar especialmente interesante, y requiere de más investigaciones.

A continuación, se muestra la Figura 5.1, resumen de todos los procesos estudiados en esta Tesis de acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina en plaquetas humanas.



**Figura 5.1. La Acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en las plaquetas.** En plaquetas en reposo la  $\alpha$ -tubulina está parcialmente acetilada y despolimerizada, al estimular con colágeno y TXA<sub>2</sub> se activa la HDAC6 que deacetilar la  $\alpha$ -tubulina, permitiendo que se reorganice el citoesqueleto para producir el cambio de forma que da lugar a la activación plaquetaria. Este mecanismo de deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina es un proceso regulado enzimáticamente. Pero hay que destacar la capacidad del AAS para acetilar de manera no enzimática la  $\alpha$ -tubulina.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento nos hacían pensar que las HDAC clásicas tienen un papel importante en la función plaquetaria, ya que el TSA, un inhibidor general de las HDAC, pero no de las sirtuinas, reducía parcialmente la agregación plaquetaria, la secreción de gránulos densos y el aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico (Figura 4.12, 4.15 y 4.18), es decir, la función plaquetaria mediante la acetilación/deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Pero esto sólo sucedía cuando las concentraciones de los agonistas (colágeno o U46619) eran bajas, ya que, a concentraciones más elevadas, esta inhibición de la HDAC6 no producía efectos funcionales significativos.

Esta falta de inhibición de la función plaquetaria a dosis más elevadas de agonista nos planteó la cuestión de que la participación de las enzimas que regulan la acetilación/deacetilación en las plaquetas podría de ser mucho más compleja. Por ello, uno de los objetivos principales de la presente Tesis, era estudiar la regulación de la acetilación/deacetilación de distintas proteínas por las HDAC, pero también por la otra gran familia de deacetilasas, las sirtuinas, así como tratar de comprender la implicación de la regulación de las sirtuinas en diferentes aspectos de la función plaquetaria y en los mecanismos de transmisión de señales.

Decidimos continuar nuestro estudio utilizando en esta ocasión un inhibidor específico de las sirtuinas, el CAM<sup>86</sup>. Encontramos que el CAM era capaz de disminuir de forma significativa las respuestas plaquetarias, como la agregación, la liberación de gránulos densos, los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y la síntesis de  $\text{TXA}_2$  (Figura 4.25 a 4.29). Es interesante que esta inhibición se producía incluso a concentraciones de agonista superiores a las utilizadas con el TSA para el estudio de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Estos resultados sugieren que las sirtuinas son reguladores centrales de la función plaquetaria, y no específica de algún agonista plaquetario, al modular probablemente alguna vía clave de la reactividad plaquetaria.

¿Pero qué sirtuina o sirtuinas son las encargadas de regular la función plaquetaria? Se han descrito hasta el momento 7 sirtuinas distintas en distintos tipos celulares. Solo dos de ellas tienen localización citoplasmática, SIRT1 y SIRT2. Nos planteamos demostrar su presencia en las plaquetas humanas. Vimos que SIRT2 y SIRT1 están presentes (Figura 4.31), aunque SIRT1 está en mucha

menor proporción en comparación con la SIRT2. Similares resultados se obtuvieron con los niveles de ARNm de SIRT2 y SIRT1 (Figura 4.32), confirmando la presencia de estas sirtuinas en las plaquetas humanas. La presencia de SIRT2 en las plaquetas ha sido posteriormente confirmada en otro estudio<sup>159</sup>. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de otras sirtuinas en las plaquetas. Por otra parte, no hemos explorado la localización subcelular de estas sirtuinas o de otras, si las hay, en las plaquetas, ya que podría ser interesante conocer si son citoplasmáticas o mitocondriales, hecho que podría tener importantes implicaciones funcionales. Actualmente, existen algunos estudios en los que se destaca el papel de la SIRT3 en la acetilación de proteínas mitocondriales de células cardíacas<sup>178</sup>. Se sabe que esta sirtuina participa activamente en la acetilación/deacetilación de proteínas mitocondriales claves en la regulación del metabolismo mitocondrial<sup>179</sup>. Sería interesante estudiar si ocurre lo mismo en las plaquetas ya que recientemente se ha demostrado la presencia de SIRT3 en las plaquetas humanas<sup>180</sup>, y además existen evidencias claras que relacionan las disfunciones mitocondriales plaquetarias con distintas patologías como la diabetes mellitus<sup>181</sup>. Por lo tanto, podría existir una relación entre la acetilación/deacetilación de proteínas mitocondriales y las alteraciones en la función plaquetaria de los pacientes con diabetes mellitus, hecho que valdría la pena explorar.

Dada la presencia de SIRT1 y SIRT2 en las plaquetas se decidió utilizar dos inhibidores específicos, EX527 (SIRT1) y AGK2 (SIRT2)<sup>86,137</sup>, para estudiar su participación en las distintas respuestas plaquetarias. Se encontró que la inhibición de SIRT1 no afectaba a la agregación plaquetaria, mientras que la inhibición de



SIRT2 provocaba una disminución significativa de la agregación (Figura 4.33). Es interesante que la mayor inhibición se alcanzara con el CAM, inhibidor general de las sirtuinas (Figura 4.33). Este mayor efecto del CAM podría estar relacionado con una concentración más alta de este inhibidor con respecto al AGK2 (100  $\mu\text{M}$  versus 10  $\mu\text{M}$ ), pero resultó imposible utilizar una mayor concentración del AGK2 debido a su insolubilidad en medio acuoso. De hecho, si se compara los resultados de la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de CAM (Figura 4.25) con los de la misma concentración de AGK2 (Figura 4.33), el CAM induce una inhibición similar o más baja que la inhibición inducida por AGK2. Comparando nuestros resultados con otro estudio realizado por Aslan *et al.*<sup>159</sup>, en el que también utiliza los inhibidores de las SIRT1 y SIRT2, observamos que no consigue inhibir de forma significativa la agregación al CRP cuando incubaba previamente las plaquetas con el AGK2. Debemos tener en cuenta que la concentración de agonista que utiliza es de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la que utilizamos nosotros es de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colágeno, mucho menos concentrado, además de ser un agonista distinto. En cambio, sí que obtenemos los mismos resultados con la inhibición de la SIRT1, a pesar de la diferencia con el agonista y la concentración. Todos juntos, estos resultados sugieren un papel importante para SIRT2 en la regulación de la agregación plaquetaria, aunque no nos permiten descartar la participación de otras sirtuinas.

Resultados similares encontramos con la inhibición específica de la SIRT2 y la secreción de gránulos densos. Cuando las plaquetas eran estimuladas con colágeno o U46619 (Figura 4.34), tanto el AGK2 como el CAM producían una disminución significativa de la serotonina, pero no así la inhibición de SIRT1. En cambio, con la

trombina no se producía esta inhibición de la secreción, solamente se producía una inhibición significativa con el CAM. Estos resultados podrían relacionarse con que la inhibición de la agregación a la trombina también es menor cuando están tratadas previamente con el AGK2 (Figura 4.33). Este resultado sugirió una especificidad en el estímulo con respecto a la regulación de la SIRT2.

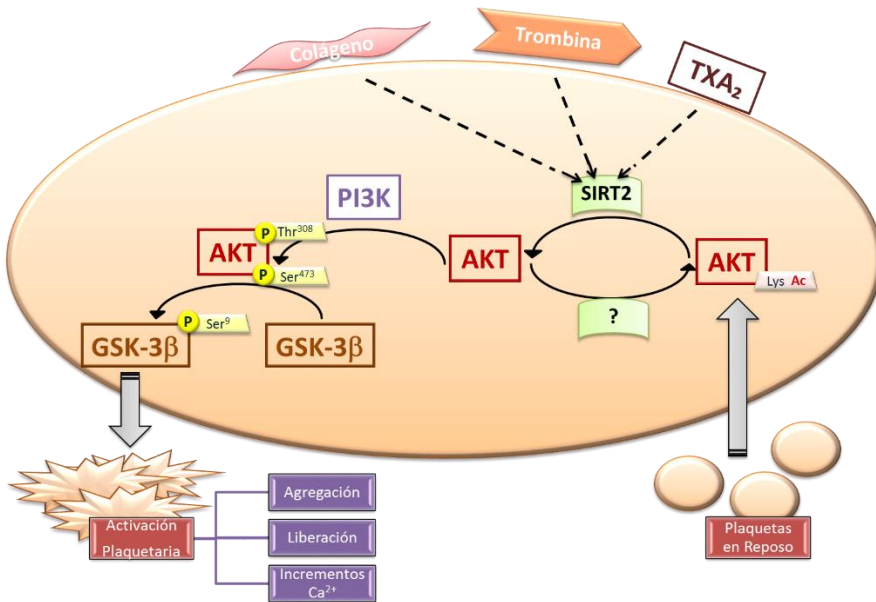
Este último resultado nos hizo plantearnos un nuevo experimento, para intentar discernir en qué punto dentro de los mecanismos de transmisión de señales que regulan la liberación de gránulos, se encuentra la acción de las sirtuinas. Decidimos utilizar el ionóforo y su capacidad de producir grandes incrementos de  $Ca^{2+}$  no mediados por mecanismos de transmisión de señales. Encontramos que en las plaquetas estimuladas con ionóforo, tratadas previamente con el CAM, AGK2 o EX527, no se afectó la liberación de la serotonina. Este resultado sugiere que los efectos inhibitorios del bloqueo de las sirtuinas se encuentran más arriba que los movimientos de  $Ca^{2+}$ , y que la inhibición observada en la liberación de la serotonina cuando las plaquetas son estimuladas con colágeno o U46619 está relacionada con la inhibición del incremento del  $Ca^{2+}$  citoplasmático. Este hecho nos llevo a estudiar los movimientos de  $Ca^{2+}$ ; el resultado que se obtuvo (Figura 4.35), es que con la inhibición específica de SIRT2 o con el CAM, inhibidor general de todas las sirtuinas, se obtuvo una disminución significativa de los niveles de  $Ca^{2+}$  en respuesta a cualquiera de los agonistas empleados. Por lo tanto, las sirtuinas también participan en esta respuesta plaquetaria, la cual es probablemente responsable de la inhibición de los distintos aspectos de la función plaquetaria observados.

El conjunto de estos resultados sugiere que SIRT2 es la principal sirtuina que regula la función plaquetaria, aunque el mayor efecto del CAM podría revelar la existencia de otras sirtuinas, que podrían desempeñar también un papel funcional en las plaquetas.

Dado que las sirtuinas participan en la función plaquetaria, se decidió explorar si los inhibidores de las alteraban el patrón de proteínas acetiladas, como hacía el TSA con la  $\alpha$ -tubulina. El resultado obtenido de la incubación de las plaquetas con los inhibidores de las sirtuinas fue, sorprendentemente, que ni el CAM, ni el AGK2 ni el EX527 alteraron de manera significativa el patrón de proteínas acetiladas en plaquetas en reposo (Figura 4.36), a pesar del notable efecto sobre la función plaquetaria. Este hecho sugería que la acetilación mediada por la inhibición de sirtuinas se debe dar en proteínas menos abundantes, que pueden estar implicadas en los mecanismos de transmisión de señales, y por tanto, más complicadas de detectar por la técnica de inmunodetección. Por otra parte, no podemos descartar que estemos ante una limitación metodológica, ya que el anticuerpo empleado para la detección de proteínas acetiladas en Lys está lejos de detectar todas estas proteínas así como todos sus puntos de acetilación porque, en realidad, se trata de un anticuerpo que reconoce Lys acetiladas pero sólo cuando se encuentran rodeadas de una serie de secuencias de aminoácidos específicas. Por tanto, es de esperar que a medida que vayan apareciendo nuevas versiones del anticuerpo (o nuevas tecnologías) capaces de detectar un mayor número de estas secuencias, aumenten igualmente la cantidad de proteínas acetiladas detectadas.

Se decidió elegir un candidato como posible diana del efecto regulador de las sirtuinas en las plaquetas, la cinasa AKT/PKB. La AKT es una de las principales enzimas de las vías de transmisión de señales en las plaquetas, regulando procesos de agregación, liberación y movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático<sup>139</sup>. Además, en otros tipos celulares se ha demostrado que la acetilación de AKT regula su función<sup>140</sup>. Encontramos que al inmunoprecipitar AKT en presencia de los distintos inhibidores de las sirtuinas, su acetilación se incrementaba por el tratamiento con AGK2 (Figura 4.37), sugiriendo que AKT podría ser diana de la deacetilasa SIRT2 en las plaquetas

Para que AKT sea activa<sup>139</sup> se requiere de su fosforilación en una Ser y una Thr. Cuando las plaquetas se activan en presencia de colágeno se produce esta fosforilación, facilitando la transmisión de señales que permite la agregación plaquetaria. Pero si estas plaquetas son tratadas previamente con el AGK2, es decir, provocamos la acetilación de AKT, ésta ya no es capaz de fosforilarse (Figura 4.38). Para comprobar si su acetilación alteraba su funcionalidad se midió su capacidad de fosforilar a GSK-3 $\beta$ , uno de sus sustratos. La inhibición de la SIRT2 por el AGK2 afectó a la fosforilación de una Ser de la GSK-3 $\beta$  (Figura 4.39). Por tanto, la acetilación de AKT inducida por la inhibición de SIRT2 puede ser al menos parcialmente, responsable de los efectos funcionales observados en las plaquetas al inhibir las sirtuinas, y estimular las plaquetas con colágeno<sup>150,151</sup> (Figura 5.2).



**Figura 5.2. La acetilación/deacetilación de la AKT regula la actividad plaquetaria.** Los diferentes agonistas plaquetarios activan a la SIRT2 provocando la deacetilación de AKT y permitiendo que se fosfore y pase a ser activa, de esta forma es capaz de fosforilar su sustrato la GSK-3β y permitir la agregación plaquetaria. Por otro lado, si se inhibe la SIRT2 con el AGK2, se favorece la acetilación de AKT y por lo tanto su inhibición e inactivación plaquetaria.

Sin embargo, la agregación inducida por el colágeno produce la acetilación de la AKT (Figura 4.40), lo que contrasta con el observado incremento de la acetilación de AKT por AGK2. Varias pueden ser las explicaciones de esta aparente paradoja. En primer lugar, la AKT puede ser acetilada en diferentes residuos de Lys, como se ha demostrado en otras proteínas<sup>182</sup>. El anticuerpo que hemos utilizado contra las proteínas acetiladas en Lys no es capaz de diferenciar la localización de la acetilación, podría ser que AKT se acetilara en sitios distintos en respuesta a la inhibición de la SIRT2 o en respuesta a la agregación inducida por un agonista fisiológico. Un estudio proteómico podría ayudar a aclarar este punto.

En segundo lugar, la cinética de fosforilación y acetilación puede ser importante: la acetilación de la AKT antes de la estimulación plaquetaria produciría una inhibición de la función plaquetaria, mientras que la acetilación inducida por el agonista formaría parte del proceso de activación. Son necesarios más estudios para entender este mecanismo.

Finalmente, estos resultados no son necesariamente los únicos que pueden dar explicación a los efectos inhibitorios de las sirtuinas. Hay muchas proteínas implicadas en los mecanismos de transmisión de señales de las plaquetas que podrían ser reguladas por acetilación/deacetilación y que en esta Tesis no se han estudiado.

En conclusión, en esta Tesis Doctoral se demuestra por primera vez que la acetilación de proteínas plaquetarias reguladas por SIRT2 juega un papel central en la función plaquetaria y en los mecanismos de transmisión de señales a través del control de la función de AKT. Estos resultados abren una nueva vía de investigación para el control de la función plaquetaria y pueden revelar nuevas dianas terapéuticas.

La importancia de la acetilación de proteínas no histonas se conoce desde hace unos pocos años, en comparación con el estudio de la acetilación en las histonas. Pero ya se conoce que esta modificación postraducciona está implicada en la regulación de diversos procesos celulares como proteínas implicadas en la reparación o replicación del ADN, proteínas estructurales de las células e incluso enzimas metabólicas, sobre todas aquellas que participan en la regulación del metabolismo intermedio<sup>183</sup>.

Casi todos los enzimas que participan en la glicolisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs, oxidación de ácidos grasos, ciclo de la urea, metabolismo del nitrógeno y metabolismo de glucógeno; se pueden acetilar/deacetilar. Incluso en algunos casos se ha demostrado que este proceso es capaz de regular la función de estas enzimas<sup>184</sup>. Además, hemos de tener en cuenta que existe una relación directa entre los metabolitos del metabolismo intermedio, como el ATP, el NAD<sup>+</sup> y el acetil-CoA, y el nivel de acetilación de las proteínas<sup>185</sup>. Cabe recordar que muchos de estos metabolitos son a la vez cofactores de los enzimas reguladores de la acetilación, como el NAD<sup>+</sup> en las sirtuinas, o como el acetil-CoA que es la molécula dadora del grupo acetilo para las acetilasas<sup>185</sup>. Por lo tanto, el hecho de que exista esta relación tan estrecha entre los metabolitos, las enzimas que regulan la acetilación de las proteínas y el metabolismo intermedio genera un gran interés, abriendo un nuevo campo de estudio en cuanto a la posible regulación de estas enzimas a través de la acetilación y una nueva aproximación al estudio de aquellas enfermedades que cursan con alteraciones del metabolismo<sup>186</sup>.

Aunque no está muy estudiado, sí que se sabe que muchas sirtuinas participan en la regulación del metabolismo intermedio. Por ejemplo, la SIRT1 regula el catabolismo de los ácidos grasos mediante la activación de la AMPK<sup>187</sup>. Estos estudios sugieren que controlar las deacetilasas y su capacidad de eliminar el grupo acetilo de los residuos de Lys en las enzimas metabólicas puede ser importante para el control del metabolismo intermedio. Sin embargo, este es un campo que se encuentra todavía en las primeras etapas de desarrollo, aunque partimos con la ventaja de que disponemos de

distintos inhibidores y activadores de las HDAC que se han desarrollado con finalidad anticancerígena<sup>188</sup>.

Un ejemplo de enfermedades que cursan con alteración del metabolismo son la obesidad y la diabetes, entre otras muchas. En los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial en el diagnóstico de personas con obesidad y diabetes<sup>189</sup>, lo que conlleva a un aumento de la morbilidad y mortalidad. Además, estas patologías provocan un incremento del riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular<sup>190</sup>. Y no solo eso, también existe una relación importante entre estas patologías y la función plaquetaria. Es decir, es un hecho conocido e investigado desde hace mucho tiempo, que los pacientes obesos y/o diabéticos presentan una mayor resistencia a los fármacos antiagregantes<sup>191</sup> y una mayor activación plaquetaria<sup>192</sup>.

De nuestros resultados se puede deducir que las acetilaciones de proteínas y las sirtuinas son importantes para la función plaquetaria, por lo que podríamos pensar que éstas podrían ser un punto de unión entre los trastornos metabólicos (obesidad y diabetes) y alteración de la función plaquetaria en estos pacientes. Sin embargo, este punto requiere más investigación. Aunque empiezan a aparecer trabajos realizados en hepatocitos de pacientes con patologías metabólicas, como la diabetes, en los que se ha observado que existe una desregulación en la acetilación de proteínas implicadas en el metabolismo intermedio, se plantea la posibilidad de emplear activadores y/o inhibidores de la actividad acetilasa/deacetilasa para controlar la diabetes y reducir sus consecuencias<sup>193</sup>. Estos estudios abren la puerta al desarrollo de nuevos tratamientos, que podrían colaborar en la corrección de la



disfunción plaquetaria que se produce en estas patologías metabólicas.

Por otra parte, y de forma tal vez sorprendente, es muy poco lo que conocemos del funcionamiento del metabolismo energético de las plaquetas, y cómo éste puede regular la función plaquetaria. En este sentido, recientes trabajos están poniendo el foco en el importante papel que juegan las mitocondrias plaquetarias en diversas respuestas funcionales<sup>194</sup>. Sería, por tanto, un interesante y novedoso campo de investigación abordar la relación entre trastornos metabólicos, metabolismo energético de las plaquetas y su posible regulación por la acetilación/deacetilación de proteínas mediada por HDAC y sirtuinas.

La presencia de diversos factores de transcripción en la plaqueta fue toda una sorpresa, porque la plaqueta carece de actividad transcripcional<sup>90</sup>. La primera explicación que se barajó era que su presencia se debía al azar, que estaban presentes en la plaqueta adulta porque habían sido arrastrados desde el megacariocito. Más recientemente, se ha sugerido que la explicación puede ser más compleja, que son varios los factores de transcripción que se han identificado en las plaquetas (PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , GR o NF $\kappa\beta$ , entre otros)<sup>90</sup>, de varios de los cuales se ha demostrado que juegan un papel importante en el control de diversos aspectos de la reactividad plaquetaria.

Las plaquetas han demostrado ser un posible modelo para el estudio de las funciones no genómicas que puedan tener los factores transcripcionales, debido a que la plaqueta no posee núcleo. Este hecho ha permitido aumentar el conocimiento sobre otras funciones

que pueden tener estos factores de la transcripción en los mecanismos de transmisión de señales en una “célula” en la que los resultados no se van a confundir por la síntesis de proteínas.

Varios son los estudios en los que se ha demostrado la presencia de STAT3 en las plaquetas y su unión con el receptor del TPO, el c-mpl. En el megacariocito se sabe que esta unión permite la activación de STAT3 y su translocación al núcleo para regular la formación de nuevas plaquetas<sup>92</sup>. Sin embargo, en las plaquetas el eje TPO-c-mpl-STAT3 juega otros papeles más allá de la regulación de la expresión de genes<sup>97</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que el TPO no es capaz de producir agregación plaquetaria, ni liberación de gránulos, actuando como “primer” y favoreciendo la acción de otros agonistas como el ADP o la epinefrina<sup>97,195</sup>. También se ha observado que existe una relación entre el TPO y la trombina, la cual incrementa la síntesis de TXA<sub>2</sub>, pero esta cooperación se anula si se tratan las plaquetas con el AAS<sup>141</sup>. Sin embargo, hasta donde sabemos, nadie ha estudiado la relación entre TXA<sub>2</sub> y el STAT3 en las plaquetas, siendo este uno de los objetivos de la presente Tesis.

Actualmente existen varios estudios realizados por Zhou *et al.*<sup>99,196</sup> en los que se ha demostrado que la fosforilación de STAT3 en las plaquetas está inducida por la activación de la GPVI inducida por el colágeno. Con la utilización de fármacos inhibitorios de STAT3, observaron que se producía una disminución de la agregación plaquetaria al colágeno y de la exposición de CD62, pero no observaron ningún efecto sobre la liberación de ATP. Por otro lado, realizaron una inmunoprecipitación de STAT3 con el objetivo de

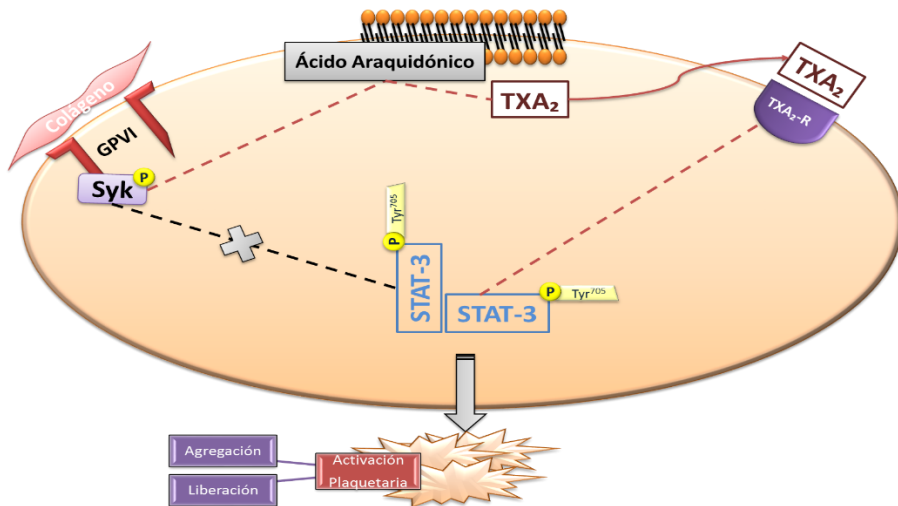
observar con qué otras proteínas interactuaban. El resultado que obtuvieron es que STAT3 se une a dos enzimas como son la cinasa Syk y la fosfolipasa PLC $\gamma$ 2, enzimas que participan en el mecanismo de transmisión de señales inducido por el estímulo con colágeno. Por todo ello, concluyeron que STAT3 participa en los mecanismos de transmisión de señales mediados por el colágeno a través de GPVI, aunque no habían demostrado una unión específica entre GPVI y STAT3. Sin embargo, sabemos que la activación plaquetaria con colágeno requiere de una importante vía de amplificación como es la síntesis de TXA $_2$  por la COX-1, de forma que el tratamiento con AAS o el bloqueo del receptor del TXA $_2$ , reduce de forma llamativa las respuestas plaquetarias al colágeno, especialmente a concentraciones de colágeno reducidas. Nos planteamos, por tanto, si STAT3 estaba directamente ligado a GPVI, o si su activación requería la síntesis de TXA $_2$  inducida por colágeno, ya que Zhou *et al* no demuestran en la inmunoprecipitación que realizan que STAT3 interactúa directamente con GPVI. En cambio, sí que existen estudios en los que se relaciona Syk con el receptor del TXA $_2$ , y cómo participa en su mecanismo de transmisión de señales<sup>197</sup>.

Para confirmar esta hipótesis decidimos por un lado, inhibir la síntesis del TXA $_2$  con el AAS (Figura 4.43), y por otro, bloquear el receptor del TXA $_2$  (Figura 4.42). En ambos experimentos se produjo una disminución significativa del nivel de fosforilación de STAT3, cuando las plaquetas eran estimuladas con colágeno. En concordancia con estos resultados, se decidió estimular con el ADP, un agonista plaquetario que apenas produce síntesis del TXA $_2$ . En este caso no se produjeron cambios del nivel de fosforilación de STAT3 (Figura 4.46). Por lo tanto, parece ser que el punto de unión

en común entre los diferentes agonistas y el STAT3, es el TXA<sub>2</sub> y la unión a su receptor.

Para confirmar más aún el papel de STAT3 en la señalización del receptor del TXA<sub>2</sub>, se evaluó la estimulación de las plaquetas con dos análogos estructuralmente distintos del TXA<sub>2</sub>, el U46619 y el IBOP (Figura 4.44). Encontramos que ambos agonistas produjeron la fosforilación de STAT3, por tanto, estos resultados demuestran que la fosforilación de STAT3 es dependiente del receptor del TXA<sub>2</sub>, y no directamente del receptor GPVI del colágeno<sup>198</sup> (Figura 5.3).

Como ya había hecho Zhou *et al.*, estimulando con colágeno, decidimos utilizar un inhibidor específico de STAT3, el STA21, y ver qué implicaciones tenía sobre la función plaquetaria cuando las plaquetas eran estimuladas directamente con los análogos del TXA<sub>2</sub>.



**Figura 5.3. La fosforilación de STAT3 está mediada por el receptor del TXA<sub>2</sub>.** STAT3 participa en los mecanismos de transmisión de señales de la plaqueta a través de la unión del TXA<sub>2</sub> a su receptor. Y no por la unión con los mecanismos de transmisión de señales asociados al receptor GPVI. La fosforilación de STAT3 inducida por el colágeno es debido a la liberación del TXA<sub>2</sub> que se produce por el estímulo del agonista.

En nuestros resultados observamos que tanto la agregación como la liberación de ATP disminuyeron de forma dosis dependiente con el STA21 al estimular las plaquetas con el U46619. Cabe destacar que la agregación era menos sensible a la inhibición de STAT3 que la liberación de ATP, incluso a las dosis más altas de STA21 (Figura 4.50 y 4.51). En paralelo se estudió la fosforilación del factor y se observó una inhibición completa de la fosforilación de STAT3 en estas condiciones (Figura 4.52). Cabe destacar que estos experimentos se realizaron también con el colágeno. En esta Tesis se ha demostrado que al inhibir STAT3 con el inhibidor específico, el STA21, se redujo tanto la agregación plaquetaria inducida por colágeno como la liberación, hecho que no se producía en los experimentos de Zhou *et al.*, como se ha comentado anteriormente. La diferencia entre estos dos resultados podría estar relacionada con la utilización de diferentes concentraciones tanto de colágeno (1 versus 2  $\mu\text{g/mL}$ ) como de inhibidor (50 versus 20  $\mu\text{M}$ ). Además, el STA21 no mostró efecto acumulativo sobre la agregación (Figura 4.52) o la liberación (Figura 4.53) cuando se utilizó el SQ, bloqueante del receptor del  $\text{TXA}_2$ .

Ampliamos un poco más el estudio y decidimos ver si la fosforilación de STAT3 mediada por el  $\text{TXA}_2$  dependía de la amplificación que se produce con el estímulo. Vimos que la fosforilación de STAT3 inducida por el U46619 disminuía con el bloqueo del receptor  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$ , mediante la utilización del 2MeSamp, pero no con el RGDS, que impide la agregación plaquetaria. Por lo tanto, la fosforilación de STAT3 es parcialmente dependiente de la liberación de ADP y su acción sobre el receptor  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$ , pero no de la agregación (Figura 4.48).

Estos resultados pueden tener varias implicaciones traslacionales. En primer lugar, STAT3 podría ser un objetivo interesante para amplificar los efectos del AAS. Como ya se ha comentado, el AAS es el antiplaquetario más utilizado para la prevención secundaria del SCA. Sin embargo, existe una gran controversia sobre si el AAS es igualmente efectivo en todos los pacientes tratado, dadas las complicaciones clínicas causadas por la baja eficacia del fármaco en algunos pacientes<sup>199</sup>. En nuestro laboratorio demostramos que incluso pequeñas concentraciones de TXA<sub>2</sub> (<3.5 ng/mL)<sup>200</sup>, equivalentes a una inhibición de la síntesis del TXA<sub>2</sub> de aproximadamente el 95% con respecto a sujetos no aspirinizados, era capaz de producir un incremento de la reactividad plaquetaria en pacientes con alteraciones vasculares<sup>199,201</sup>. Por lo tanto, la señalización del TXA<sub>2</sub> a través su receptor y STAT3 podrían actuar como “primer” reduciendo el efecto beneficioso del AAS. Esta hipótesis debería de ser comprobada.

Por otro lado, la unión de las plaquetas desializadas, es decir, las más viejas, a los receptores “Ashwell-Morell” de los hepatocitos, inducen la síntesis de TPO mediante un mecanismo de transmisión de señales que implica la fosforilación de STAT3<sup>202</sup>, regulando de esta manera la producción de plaquetas nuevas. Además, los hepatocitos expresan receptores del TXA<sub>2</sub><sup>203</sup> y contienen ARNm del TXA<sub>2</sub> (observaciones no publicadas). Curiosamente, en nuestro laboratorio hemos observado que existe una correlación positiva entre la síntesis de TXA<sub>2</sub> y los niveles de TPO circulante en pacientes con SCA tratados con el AAS (enviado a publicar). Por lo tanto, se podría especular que el TXA<sub>2</sub> podría regular la producción

de TPO hepático a través del receptor  $\text{TXA}_2$  y la fosforilación de STAT3, aunque esta relación debería de ser más estudiada.

Finalmente, el uso de inhibidores de STAT3 en pacientes con cáncer debería considerar la posibilidad de que las complicaciones hemorrágicas asociadas al tratamiento estén causadas no sólo por la trombocitopenia asociada habitualmente a estos tratamientos<sup>204</sup>, sino quizás también por la inhibición de la fosforilación de STAT3 en el mecanismo de transmisión de señales, alterando de esta forma la función plaquetaria.

En conclusión, estos resultados sugieren que la fosforilación de STAT3 está relacionada con la señalización del receptor del  $\text{TXA}_2$ , aunque no se puede descartar la participación de otras rutas independientes.





## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. El proceso enzimático de la acetilación/deacetilación de proteínas no histonas en las plaquetas, es un nuevo regulador de la función plaquetaria. Constituye un importante mecanismo de transmisión de señales en las plaquetas, que puede tener importantes implicaciones fisiopatológicas.

2. Las plaquetas humanas presentan un acetiloma característico, que está regulado por diversas actividades deacetilasas, y varía con la agregación plaquetaria.

3. La regulación enzimática de la acetilación/deacetilación de proteínas no histonas tiene importantes consecuencias en la funcionalidad de las plaquetas, tanto a nivel de la agregación plaquetaria como, la liberación de gránulos o los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestros resultados demuestran que tanto la HDAC6 como la SIRT2 juegan un papel importante en la reactividad plaquetaria.

4. La HDAC6 participa en la regulación de la función plaquetaria a través del control de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina.

5. La regulación de la función plaquetaria por la SIRT2 está mediada, al menos parcialmente, por su control de la acetilación de AKT. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otras proteínas implicadas en los sistemas de transmisión de señales en las plaquetas.

6. Nuestros resultados sugieren que la acetilación inducida por el AAS de proteínas distintas de COX-1 podría ser un nuevo mecanismo de acción del AAS al provocar la acetilación de diversas proteínas, como la  $\alpha$ -tubulina. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer la importancia de la acetilación de estas proteínas en las respuestas a aspirina COX-1 independientes.

7. El factor de transcripción STAT3, participa en la regulación de la función plaquetaria, formando parte de los mecanismos de transmisión de señales a través del receptor del TXA<sub>2</sub>.

8. Conocer el papel de los factores de transcripción en los mecanismos de transmisión de señales en células anucleadas como la plaqueta puede mejorar el entendimiento de los complejos mecanismos de activación plaquetar y puede sugerir nuevas dianas farmacológicas para el control de la función plaquetaria.

9. La acetilación de proteínas no histonas se ha implicado en la regulación del metabolismo energético de diversos tipos celulares. Por tanto, nuestros resultados abren la puerta a la interesante posibilidad de que la acetilación de proteínas en las plaquetas actúe como un nexo entre alteraciones metabólicas, como la diabetes o la obesidad, y la conocida hiperfunción plaquetaria que estas producen.

10. En los últimos años se han desarrollado diversos reguladores farmacológicos de HDAC para el tratamiento de diferentes patologías, incluyendo el cáncer. Nuestros resultados sugieren que podrían tener efectos indeseados sobre la función de las plaquetas con las posibles complicaciones hemorrágicas que esto podría conllevar. Por otra parte, también sugieren que la regulación de las acetilaciones en las plaquetas podría constituir una nueva diana farmacológica para el desarrollo de tratamientos antiagregantes.



## 7. BIBLIOGRAFÍA





## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Izaguirre-Avila R. El descubrimiento de las plaquetas. *Revista Biomedica*. 1997;8:197-208.
2. Ribatti D, Crivellato E. Giulio bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*. 2007;31(10):1339-1341.
3. Mazzarello P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio bizzozero: A pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):776-781.
4. Wright J. The origin and nature of the blood plates. *Boston Medical and Surgical Journal*. 1906;154:643-645.
5. Moscardo A, Latorre A, Santos MT, Bonanad S, Valles J. Platelet function in malignant hematological disorders. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(6):522-531.
6. Marcus AJ. Platelets: Their role in hemostasis, thrombosis and inflammation. In: Gallin JS, R., ed. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:75-99.
7. Marcus AJ, Zucker-Franklin D, Safier LB, Ullman HL. Studies on human platelet granules and membranes. *J Clin Invest*. 1966;45(1):14-28.

8. Ware, JA, Collier, BS. Platelet morphology, biochemistry and function. 5 th ed. New York: Williams Hematology. McGraw-Hill; 1995.
9. Marcus AJ. Platelets and their disorders. In: Ratnoff, OD, Forbes, CD., ed. *Disorders of hemostasis*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996:79-137.
10. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost*. 2008;99(2):253-263.
11. Cadroy, Y, Harker, LA. Platelets, thrombosis, and antithrombotic therapies. In: Antonaccio M, ed. *Cardiovascular pharmacology*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1990:515-539.
12. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: A comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:133-148.
13. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324(7329):71-86.
14. Valles J, Lago A, Santos MT, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: Prognostic significance. *Thromb Haemost*. 2017;117(10):1919-1929.
15. Mendez R, Moscardo A, Latorre A, et al. Soluble P-selectin in acute exacerbations and stable bronchiectasis in adults. *Ann Am Thorac Soc*. 2019.

16. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94(5):700-711.
17. Kapur R, Zufferey A, Boilard E, Semple JW. Nouvelle cuisine: Platelets served with inflammation. *J Immunol*. 2015;194(12):5579-5587.
18. Peters AM, Lavender JP. Platelet kinetics with indium-111 platelets: Comparison with chromium-51 platelets. *Semin Thromb Hemost*. 1983;9(2):100-114.
19. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:781857.
20. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):186-193.
21. Moscardo A, Valles J, Latorre A, Santos MT. The association of thromboxane A2 receptor with lipid rafts is a determinant for platelet functional responses. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3154-3159.
22. Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: Its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thromb Haemost*. 1978;40(2):224-231.
23. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(11):658-670.

24. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*. 2008;111(9):4605-4616.
25. Redondo PC, Harper AG, Sage SO, Rosado JA. Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets. *Cell Signal*. 2007;19(10):2147-2154.
26. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):191-204.
27. Holmsen H. Biochemistry of the platelet: Energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Slazman EW, ed. *Hemostasis and thrombosis. basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia: Jb Lippincott Company; 1982:431-443.
28. Piersma SR, Broxterman HJ, Kapci M, et al. Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate. *J Proteomics*. 2009;72(1):91-109.
29. Italiano JE, Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: Pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-1233.
30. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE, Jr. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*. 2014;123(1):101-112.

31. Flaumenhaft R. Platelet secretion. In: Michelson AD, editors. *Platelets*. 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013:343-366.
32. Schubert S, Weyrich AS, Rowley JW. A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood*. 2014;124(4):493-502.
33. Mayr M, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):206-214.
34. Laffont B, Corduan A, Ple H, et al. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2\*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013;122(2):253-261.
35. Suades R, Padro T, Badimon L. The role of blood-borne microparticles in inflammation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2015.
36. Moscardo A, Valles J, Pinon M, Aznar J, Martinez-Sales V, Santos MT. Regulation of cytosolic PIA2 activity by PP1/PP2A serine/threonine phosphatases in human platelets. *Platelets*. 2006;17(6):405-415.
37. Valles J, Moscardo A, Madrid I, Santos MT. Pharmacological inhibition of platelet reactivity. clinical and pharmacodynamic effects. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(4):431-447.
38. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*. 2007;100(12):1673-1685.

39. Santos MT, Moscardo A, Valles J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation*. 2000;102(16):1924-1930.
40. Moscardo A, Santos MT, Latorre A, Madrid I, Valles J. Serine/threonine phosphatases regulate platelet alphaIIb beta3 integrin receptor outside-in signaling mechanisms and clot retraction. *Life Sci*. 2013;93(20):707-713.
41. Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):246-258.
42. Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2011;106(5):827-838.
43. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1800-1814.
44. Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):298-307.
45. Furman MI, Liu L, Benoit SE, Becker RC, Barnard MR, Michelson AD. The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3082-3087.

46. Lasne D, Donato J, Falet H, Rendu F. Different abilities of thrombin receptor activating peptide and thrombin to induce platelet calcium rise and full release reaction. *Thromb Haemost.* 1995;74(5):1323-1328.
47. Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV, Benzakour O. Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 1996;8(1):59-66.
48. Born GV. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: An editorial view. *Circulation.* 1985;72(4):741-746.
49. Gachet C, Hechler B, Leon C, et al. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):271-275.
50. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2024-2029.
51. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, et al. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem.* 2001;276(11):8608-8615.
52. Cattaneo M. Hereditary defect of the platelet ADP receptor(s). *Platelets.* 1998;9(3-4):161-164.

53. Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, et al. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood*. 1999;94(12):4156-4165.
54. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: Further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):E101-6.
55. MacKenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem*. 1996;271(6):2879-2881.
56. Mahaut-Smith MP, Ennion SJ, Rolf MG, Evans RJ. ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: Evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br J Pharmacol*. 2000;131(1):108-114.
57. Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, et al. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res*. 2001;89(3):211-223.
58. Plow EF, Cierniewski CS, Xiao Z, Haas TA, Byzova TV. AlphaIIb beta3 and its antagonism at the new millennium. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):34-40.



59. Petrich BG, Marchese P, Ruggeri ZM, et al. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J Exp Med*. 2007;204(13):3103-3111.
60. Kenneth J. Clemetson, Jeannine M. Clemetson. Molecular basis of platelet function. In: Alan D. Michelson, editots. *Platelets*. 2013:1329-1353.
61. Margaret L. Rand, Sara J. Israels. Molecular and cellular basis of hematology. . 2018:2333-2374.
62. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):241-246.
63. Bartels M, Govers A, Polak R, et al. Megakaryocyte lineage development is controlled by modulation of protein acetylation. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196400.
64. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*. 2000;184(1):1-16.
65. Petrella A, Fontanella B, Carratu A, Bizzarro V, Rodriguez M, Parente L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(6):519-527.
66. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1864(10):1372-1401.

67. Zhang J, Sprung R, Pei J, et al. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in escherichia coli. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(2):215-225.
68. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325(5942):834-840.
69. Kim GW, Yang XJ. Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(4):211-220.
70. Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:371832.
71. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231(25):232-235.
72. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*. 1975;56(3):624-632.
73. Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase enzymes: Regulation and function. *Curr Pharm Des*. 2004;10(6):577-588.
74. Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. part 1: Mechanisms and clinical measurements. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):273-282.

75. Kouzarides T. Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 2000;19(6):1176-1179.
76. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):185-198.
77. Lu Z, Cheng Z, Zhao Y, Volchenbom SL. Bioinformatic analysis and post-translational modification crosstalk prediction of lysine acetylation. *PLoS One.* 2011;6(12):e28228.
78. Zhao S, Xu W, Jiang W, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science.* 2010;327(5968):1000-1004.
79. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10224-10229.
80. Allis CD, Berger SL, Cote J, et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell.* 2007;131(4):633-636.
81. Friedmann DR, Marmorstein R. Structure and mechanism of non-histone protein acetyltransferase enzymes. *FEBS J.* 2013;280(22):5570-5581.
82. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkuhler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* 2007;17(3):195-211.

83. Sauve AA, Youn DY. Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(5-6):535-543.
84. Shen Y, Wei W, Zhou DX. Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression. *Trends Plant Sci.* 2015;20(10):614-621.
85. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17174-17179.
86. Villalba JM, Alcain FJ. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors.* 2012;38(5):349-359.
87. Warshaw AL, Laster L, Shulman NR. The stimulation by thrombin of glucose oxidation in human platelets. *J Clin Invest.* 1966;45(12):1923-1934.
88. Booyse F, Rafelson ME, Jr. In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets. *Nature.* 1967;215(5098):283-284.
89. Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3370-3377.
90. Lannan KL, Sahler J, Kim N, et al. Breaking the mold: Transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol.* 2015;6:48.

91. Chen K, Rondina MT, Weyrich AS. A sticky story for signal transducer and activator of transcription 3 in platelets. *Circulation*. 2013;127(4):421-423.
92. Ezumi Y, Takayama H, Okuma M. Thrombopoietin, c-mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Lett*. 1995;374(1):48-52.
93. Zhuang S. Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell Signal*. 2013;25(9):1924-1931.
94. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
95. Icardi L, De Bosscher K, Tavernier J. The HAT/HDAC interplay: Multilevel control of STAT signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(6):283-291.
96. Ozaki K, Oda A, Wakao H, et al. Thrombopoietin induces association of crkl with STAT5 but not STAT3 in human platelets. *Blood*. 1998;92(12):4652-4662.
97. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood*. 1996;87(2):439-446.
98. Dellas C, Schafer K, Rohm IK, et al. Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: Importance of JAK2 and the

phospholipases Cgamma2 and A2. *Thromb Haemost.* 2007;98(5):1063-1071.

99. Zhou Z, Gushiken FC, Bolgiano D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity. *Circulation.* 2013;127(4):476-485.

100. Kozus E, Torchia J, Rose DW, et al. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science.* 1998;279(5351):703-707.

101. Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M, Blobel GA. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: Role of ets transcription factors. *EMBO J.* 2002;21(19):5225-5234.

102. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science.* 2005;307(5707):269-273.

103. Jain S, Wei J, Mitrani LR, Bishopric NH. Auto-acetylation stabilizes p300 in cardiac myocytes during acute oxidative stress, promoting STAT3 accumulation and cell survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135(1):103-114.

104. Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc.* 2010;132(31):10842-10846.

105. Dallavalle S, Pisano C, Zunino F. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(6):756-765.
106. Valles J, Santos MT, Aznar J, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood.* 1991;78(1):154-162.
107. World Medical Association. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-2194.
108. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-929.
109. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):2994-2998.
110. Cortina B, Torregrosa G, Castello-Ruiz M, et al. Improvement of the circulatory function partially accounts for the neuroprotective action of the phytoestrogen genistein in experimental ischemic stroke. *Eur J Pharmacol.* 2013;708(1-3):88-94.
111. Santos MT, Moscardo A, Latorre A, Cortina B, Valles J. The time between venepuncture and blood incubation is critical for serum thromboxane B2 synthesis. *Platelets.* 2017;28(3):310-311.

112. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol.* 1982;243(3):R454-61.

113. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-3450.

114. Benet M, Moya M, Donato MT, et al. A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Arch Toxicol.* 2014;88(4):967-982.

115. Bachelot C, Cano E, Grelac F, et al. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. simultaneous studies with different agonists and inhibitors. *Biochem J.* 1992;284 (Pt 3)(Pt 3):923-928.

116. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-149.

117. Fox JE, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J Biol Chem.* 1993;268(34):25973-25984.

118. Giannini G, Cabri W, Fattorusso C, Rodriguez M. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: Overview and perspectives. *Future Med Chem.* 2012;4(11):1439-1460.



119. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):10.3390/ijms18071414.
120. Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):938-947.
121. Tran AD, Marmo TP, Salam AA, et al. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 8):1469-1479.
122. Schemies J, Sippl W, Jung M. Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. *Cancer Lett*. 2009;280(2):222-232.
123. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417(6887):455-458.
124. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 2003;11(2):437-444.
125. Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, et al. HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood*. 2012;120(20):4215-4218.
126. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: Inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost*. 1999;82(2):318-325.

127. Peerschke EI, Galanakis DK. The synthetic RGDS peptide inhibits the binding of fibrinogen lacking intact alpha chain carboxyterminal sequences to human blood platelets. *Blood*. 1987;69(3):950-952.
128. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J*. 1995;312 ( Pt 1)(Pt 1):1-11.
129. Rosado JA, Sage SO. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(8):327-332.
130. Redondo PC, Harper MT, Rosado JA, Sage SO. A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *Blood*. 2006;107(3):973-979.
131. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 2003;110(5-6):255-258.
132. Alfonso LF, Srivenugopal KS, Bhat GJ. Does aspirin acetylate multiple cellular proteins? (review). *Mol Med Rep*. 2009;2(4):533-537.
133. Xu AS, Ohba Y, Vida L, Labotka RJ, London RE. Aspirin acetylation of betaLys-82 of human hemoglobin. NMR study of acetylated hemoglobin tsumurai. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(7):917-922.

134. Tatham MH, Cole C, Scullion P, et al. A proteomic approach to analyze the aspirin-mediated lysine acetylation. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(2):310-326.
135. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: The road ahead. *Front Pharmacol*. 2012;3:4.
136. Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res*. 2006;66(8):4368-4377.
137. Gertz M, Fischer F, Nguyen GT, et al. Ex-527 inhibits sirtuins by exploiting their unique NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(30):E2772-81.
138. Dangelmaier C, Manne BK, Liverani E, Jin J, Bray P, Kunapuli SP. PDK1 selectively phosphorylates thr(308) on akt and contributes to human platelet functional responses. *Thromb Haemost*. 2014;111(3):508-517.
139. O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, Du X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2011;118(15):4215-4223.
140. Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, et al. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal*. 2011;4(182):ra46.

141. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13480-13484.

142. Moers A, Nieswandt B, Massberg S, et al. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med.* 2003;9(11):1418-1422.

143. Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa JP, Bryckaert M. Costimulation of the gi-coupled ADP receptor and the gq-coupled TXA2 receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS Lett.* 2004;556(1-3):227-235.

144. Valles J, Santos MT, Aznar J, et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: The effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation.* 1998;97(4):350-355.

145. Ohlmann P, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Offermanns S, Gachet C. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of galphaq. *Blood.* 2000;96(6):2134-2139.

146. Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, Rauchfuss S, Gambaryan S, Walter U. Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A2 and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood*. 2007;109(2):616-618.
147. Phillips DM. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J*. 1963;87:258-263.
148. Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Khochbin S. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:970382.
149. Norvell A, McMahon SB. Cell biology. rise of the rival. *Science*. 2010;327(5968):964-965.
150. Moscardo A, Valles J, Latorre A, Jover R, Santos MT. The histone deacetylase sirtuin 2 is a new player in the regulation of platelet function. *J Thromb Haemost*. 2015.
151. Latorre A, Moscardo A. Regulation of platelet function by acetylation/deacetylation mechanisms. *Curr Med Chem*. 2016;23(35):3966-3974.
152. Aslan JE, Rigg RA, Nowak MS, et al. Lysine acetyltransferase supports platelet function. *J Thromb Haemost*. 2015;13(10):1908-1917.
153. Sullivan KF. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:687-716.

154. Iancu-Rubin C, Gajzer D, Mosoyan G, Feller F, Mascarenhas J, Hoffman R. Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Exp Hematol.* 2012;40(7):564-574.
155. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood.* 2005;106(13):4076-4085.
156. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(12):773-786.
157. Castro-Castro A, Janke C, Montagnac G, Paul-Gilloteaux P, Chavrier P. ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(11-12):950-960.
158. Kunert S, Meyer I, Fleischhauer S, et al. The microtubule modulator RanBP10 plays a critical role in regulation of platelet discoid shape and degranulation. *Blood.* 2009;114(27):5532-5540.
159. Aslan JE, Phillips KG, Healy LD, Itakura A, Pang J, McCarty OJ. Histone deacetylase 6-mediated deacetylation of alpha-tubulin coordinates cytoskeletal and signaling events during platelet activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(12):C1230-9.

160. Sadoul K, Khochbin S. The growing landscape of tubulin acetylation: Lysine 40 and many more. *Biochem J*. 2016;473(13):1859-1868.
161. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*. 2007;26(37):5468-5476.
162. Li L, Yang XJ. Tubulin acetylation: Responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(22):4237-4255.
163. Pandey K, Sharma SK. Activity-dependent acetylation of alpha tubulin in the hippocampus. *J Mol Neurosci*. 2011;45(1):1-4.
164. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357(24):2482-2494.
165. Hancock WW, Akimova T, Beier UH, Liu Y, Wang L. HDAC inhibitor therapy in autoimmunity and transplantation. *Ann Rheum Dis*. 2012;71 Suppl 2:i46-54.
166. Duvic M, Vu J. Vorinostat in cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs Today (Barc)*. 2007;43(9):585-599.
167. De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood*. 2013;121(10):e70-80.

168. Moj D, Britz H, Burhenne J, et al. A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor vorinostat for pediatric and adult patients and its application for dose specification. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80(5):1013-1026.
169. Aslan JE, David LL, McCarty OJ. Data detailing the platelet acetyl-lysine proteome. *Data Brief.* 2015;5:368-371.
170. Zhang Y, Zhang M, Dong H, et al. Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene.* 2009;28(3):445-460.
171. Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Lin X, Trump DL, Gao AC. Stat3 activation of NF- $\kappa$ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7264-7269.
172. Undas A, Brummel-Ziedins K, Mann KG. Why does aspirin decrease the risk of venous thromboembolism? on old and novel antithrombotic effects of acetyl salicylic acid. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1776-1787.
173. Skelin M, Javor E, Lucijanac M. Aspirin use and the risk of cancer. *JAMA Oncol.* 2019.
174. Jung SB, Kim CS, Naqvi A, et al. Histone deacetylase 3 antagonizes aspirin-stimulated endothelial nitric oxide production by reversing aspirin-induced lysine acetylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2010;107(7):877-887.



175. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Circulation*. 2011;123(7):798-813.
176. Finamore F, Reny JL, Malacarne S, Fontana P, Sanchez JC. A high glucose level is associated with decreased aspirin-mediated acetylation of platelet cyclooxygenase (COX)-1 at serine 529: A pilot study. *J Proteomics*. 2019;192:258-266.
177. Finamore F, Reny JL, Malacarne S, Fontana P, Sanchez JC. Shotgun proteomics data on the impact of hyperglycaemia on platelet protein acetylation by aspirin. *Data Brief*. 2018;21:2475-2481.
178. Parodi-Rullan RM, Chapa-Dubocq XR, Javadov S. Acetylation of mitochondrial proteins in the heart: The role of SIRT3. *Front Physiol*. 2018;9:1094.
179. Baeza J, Smallegan MJ, Denu JM. Mechanisms and dynamics of protein acetylation in mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):231-244.
180. Kumari S, Chaurasia SN, Nayak MK, Mallick RL, Dash D. Sirtuin inhibition induces apoptosis-like changes in platelets and thrombocytopenia. *J Biol Chem*. 2015;290(19):12290-12299.
181. Wang L, Wu Q, Fan Z, Xie R, Wang Z, Lu Y. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(6):1213-1223.

182. Bishton MJ, Harrison SJ, Martin BP, et al. Deciphering the molecular and biologic processes that mediate histone deacetylase inhibitor-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2011;117(13):3658-3668.
183. Yang XJ, Gregoire S. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein nepsilon - and O-acetylation. *EMBO Rep*. 2007;8(6):556-562.
184. Guan KL, Xiong Y. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(2):108-116.
185. Menzies KJ, Zhang H, Katsyuba E, Auwerx J. Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(1):43-60.
186. Padro T, Vilahur G, Badimon L. Dyslipidemias and microcirculation. *Curr Pharm Des*. 2018;24(25):2921-2926.
187. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Ann Med*. 2011;43(3):198-211.
188. Roche J, Bertrand P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2016;121:451-483.
189. Global BMI Mortality C, Di Angelantonio E, Bhupathiraju S, et al. Body-mass index and all-cause mortality: Individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*. 2016;388(10046):776-786.

190. Csige I, Ujvarosy D, Szabo Z, et al. The impact of obesity on the cardiovascular system. *J Diabetes Res*. 2018;2018:3407306.
191. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2012;13(1):27-42.
192. Santilli F, Simeone P, Liani R, Davi G. Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;120:28-39.
193. Nerurkar PV, Nerurkar VR. Respected sir(2): Magic target for diabetes. *Cellscience*. 2008;4(4):82-96.
194. Fuentes E, Araya-Maturana R, Urra FA. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. *Free Radic Biol Med*. 2019;136:172-182.
195. Griesshammer M, Hornkohl A, Nichol JL, et al. High levels of thrombopoietin in sera of patients with essential thrombocythemia: Cause or consequence of abnormal platelet production? *Ann Hematol*. 1998;77(5):211-215.
196. Yuan H, Houck KL, Tian Y, et al. Piperlongumine blocks JAK2-STAT3 to inhibit collagen-induced platelet reactivity independent of reactive oxygen species. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143964.
197. Badolia R, Inamdar V, Manne BK, Dangelmaier C, Eble JA, Kunapuli SP. Gq pathway regulates proximal C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) signaling in platelets. *J Biol Chem*. 2017;292(35):14516-14531.

198. Latorre A, Santos T, Valles J, Bonanad S, Moscardo A. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Phosphorylation Regulates Thromboxane A2 Receptor Activity in Human Platelets. *British Journal of Haematology*. 2019; BJH-2019-01697.R1.
199. Santos MT, Valles J, Lago A, et al. Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *J Thromb Haemost*. 2008;6(4):615-621.
200. Santos MT, Madrid I, Moscardo A, et al. The administration of a loading dose of aspirin to patients presenting with acute myocardial infarction while receiving chronic aspirin treatment reduces thromboxane A2-dependent platelet reactivity. *Platelets*. 2014;25(4):268-273.
201. Moscardo A, Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Valles J. Residual cyclooxygenase-1 activity and epinephrine reduce the antiplatelet effect of aspirin in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2011;105(4):663-669.
202. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: Glycans and beyond. *Blood*. 2015;126(16):1877-1884.
203. Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, et al. Thromboxane A(2) receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;259(1):104-114.

204. Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and approaches of targeting STAT3 for cancer treatment. *ACS Chem Biol.* 2016;11(2):308-318.



## **8. ANEXO**





A continuación, se incluyen los artículos publicados relacionados con la presente Tesis Doctoral



Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Phosphorylation Regulates  
Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor Activity in Human Platelets.

Ana María Latorre, María Teresa Santos, Juana Vallés, Santiago Bonanad, Antonio  
Moscardó\*

Health Research Institute La Fe, Haemostasis and Thrombosis Unit, University and  
Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain.

Running Title: TXA<sub>2</sub> regulates STAT3 in platelets

\*To whom correspondence should be addressed: Antonio Moscardó. IIS La Fe, Hospital  
Universitario y Politécnico La Fe, Avd Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia,  
Spain Tel: (+34) 961246638; E-mail: moscardo\_ant@gva.es

Word Count: 930

Key words. Platelets, signal transduction, STAT3, Thrombopoietin, Thromboxane A<sub>2</sub>



FINAL

Send Orders for Reprints to [reprints@benhamscience.ae](mailto:reprints@benhamscience.ae)

Current Medicinal Chemistry, 2016, 23, 1-9

1

## REVIEW ARTICLE

## Regulation of Platelet Function by Acetylation/Deacetylation Mechanisms

Ana Latorre and Antonio Moscardó\*

Instituto Investigación Sanitaria La Fe, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

**Abstract:** Reversible acetylation of histones is a well-known mechanism of epigenetic regulation of gene expression. More recently, studies have demonstrated that acetylation/deacetylation in several proteins regulate multiple aspects of cellular activity, especially those associated with energetic metabolism. Platelets are key participants in haemostasis and cardiovascular diseases. Although metabolic changes such as diabetes or lipidemia are well recognized risk factors for cardiovascular diseases, there is very little information about the relationship between metabolism and platelet reactivity. Recent studies have reported that different aspects of platelet function such as adhesion, aggregation, or granule release could also be regulated by acetylation of proteins. These cycles of acetylation/deacetylation are regulated by the contrasting action of acetyltransferases and deacetylases, which have been described by the presence of p300 and HDAC6, and sirtuins, respectively, in platelets. Remarkably, deacetylases, especially sirtuins, have been the subjects of intensive pharmaceutical research due to their implication in several physiological and pathological processes in organisms. The discovery of acetylation mechanisms in platelets opens new possibilities for the treatment and prevention of cardiovascular diseases through the regulation of acetylases/deacetylases in platelets. Therefore, the aim of this review is to present some recent reports concerning the role of acetylation of proteins in the control of platelet function, and the new possibilities of regulation of platelet function that this represent.



Antonio Moscardó

## ARTICLE HISTORY

Received April 03, 2016  
 Revised June 08, 2016  
 Accepted September 03, 2016

DOI: 10.2174/092966732300010019  
 0929-6673

**Keywords:** Acetylation, platelets, cardiovascular disease, aspirin, cancer, sirtuins.

## PLATELETS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Cardiovascular diseases (CVD) are a leading cause of mortality in developed countries. Despite considerable progress in recent years, substantial gaps are still present in our understanding of the mechanisms that regulate the formation of an occlusive thrombus. It is interesting to note that many of these gaps are related to the functional aspects of the apparently simple platelet cell, which participates in thrombosis. Platelets play a key role in protective haemostasis and pathological thrombosis. This has been largely demonstrated by the relationship of quantitative and/or qualitative disorders of platelets with bleeding and by the clinical benefits of

antiplatelet drugs in preventing recurrent events in patients with CVD. However, recent evidence suggest that platelets could act as cellular mediators in many other physiological and pathophysiological responses, such as safeguarding vessel integrity, immunity, inflammation, cancer, and angiogenesis [1,2].

Despite its apparent simplicity, the platelet is a highly specialized functional entity, given its central role in the haemostatic and thrombotic processes. To perform these functions, platelets have a variety of receptors on their surface that respond to multiple stimuli. They also have the ability to store, synthesize and release different compounds, and contain a complex signal transmission system that integrates the signals to specifically respond to each stimulus [1]. These mechanisms of signal transduction include protein phosphorylation on tyrosine [2] and serine/threonine [3,4],

\*Address correspondence to this author at the IIS La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avd Fernando Abril Martorell, P.O. Box: 46026, Valencia, Spain; Tel/Fax: +34-961-246-638, +34-961-246-620; E-mail: [moscardó\\_ast@iiva.es](mailto:moscardó_ast@iiva.es)



## ORIGINAL ARTICLE

## The histone deacetylase sirtuin 2 is a new player in the regulation of platelet function

A. MOSCARDÓ,\* J. VALLÉS,\* A. LATORRE,\* R. JOVERT†‡ and M. T. SANTOS\*

\*Instituto Investigación Sanitaria Hospital La Fe, IS La Fe, University Hospital La Fe; †Experimental Hepatology Unit, IS La Fe, CIBERehb and ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, Valencia, Spain

To cite this article: Moscardó A, Vallés J, Latorre A, Jover R, Santos MT. The histone deacetylase sirtuin 2 is a new player in the regulation of platelet function. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1335-44.

**Summary.** *Background:* Histone deacetylases (HDACs) play a key role in signaling in many cell types. However, little is known about the participation of HDACs, particularly sirtuins (SIRT), in platelet reactivity. *Objective:* To investigate the role of HDACs in platelets, we examined the effects of SIRT inhibition on platelet function and protein acetylation in human platelets. *Methods:* We used washed platelets obtained from healthy subjects. Cambinol (SIRT1 and SIRT2 inhibitor), AGK2 (specific SIRT2 inhibitor) and EX527 (specific SIRT1 inhibitor) were used as SIRT inhibitors. Platelets were stimulated with collagen, thrombin, or U46619, and platelet responses were determined according to optical aggregometry findings, dense granule release, and cytosolic calcium levels (Fluorescence). Protein acetylation and phosphorylation were assessed by immunoblotting. *Results:* SIRT inhibition remarkably reduced platelet responses (aggregation, granule release, and cytosolic calcium level;  $P < 0.05$ ). SIRT2 was present in platelets at the level of mRNA and protein, and its specific inhibition reduced platelet responses. The acetylated protein pattern observed in resting platelets changed during platelet aggregation. Inhibition of SIRT2 increased the acetylation of Akt kinase, which in turn blocked agonist-induced Akt phosphorylation and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylation, which are markers of Akt activity. Finally, collagen-induced aggregation provoked Akt acetylation. *Conclusions:* Regulation of protein acetylation by SIRT2 plays a central role in platelet function. The effects of SIRT2 are mediated in part by the acetylation and inhibition of Akt. These results open a new avenue for

research into the control of platelet function, and may help to identify new therapeutic targets.

**Keywords:** acetylation; Akt3 protein kinase; blood platelet; signal transduction; sirtuins.

### Introduction

Lysine acetylation is a key post-translational protein modification that affects histones and regulates gene expression [1,2]. In addition, recent proteomic studies have described unexpected roles of lysine acetylation in several other cellular processes, such as the regulation of intermediate metabolism, microtubule reorganization, and the cell cycle. Choudhary *et al.* [3] identified > 3500 acetylation sites in ~ 1700 acetylated proteins, which is comparable to the 6600 phosphorylation sites in ~ 2200 proteins described previously. Therefore, the size of the acetylome is quickly approaching that of the phosphoproteome, which suggests that lysine acetylation plays a major role in signal transduction processes [4,5].

The acetylation of lysines is regulated by the equilibrium between histone acetyltransferases, which add acetyl groups, and histone deacetylases (HDACs), which remove acetyl groups [6]. The 18 known HDACs are classified into four families. Classes I and II are referred to as 'classic' HDACs; their enzymatic activity is inhibited by trichostatin A (TSA). HDAC11 is the only known class IV HDAC, and it is insensitive to TSA. In mammalian cells, the class III deacetylase family, commonly referred to as the sirtuins (SIRT), includes seven members that are structurally unrelated to HDACs and require NAD<sup>+</sup> as a cosubstrate. The SIRTs are inhibited by nicotinamide, but not by TSA. The localization of SIRTs in the cytoplasm was an early indication that protein acetylation has a non-nuclear function. Genetic studies in different model organisms have implicated the SIRTs in lifespan control, caloric restriction, and other nutrient responses that are directly linked to metabolic regulation [7]. These studies provide genetic evidence for

Correspondence: Antonio Moscardó, IS La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avd Fernando Abril Martorell, 46026 Valencia, Spain.

Tel.: +34 961 246638; fax: +34 96 1246 620.  
E-mail: moscardó\_anto@jgva.es

Received 24 June 2014

Manuscript handled by: Y. Ozaki

Final decision: P. H. Reintema, 23 April 2015

© 2015 International Society on Thrombosis and Haemostasis





**Soluble P-selectin in Acute Exacerbations and Stable Bronchiectasis in Adults**

Raúl Méndez<sup>1,2</sup>, Antonio Moscardó<sup>2</sup>, Ana Latorre<sup>3</sup>, Laura Feced<sup>1,2</sup>, Paula González-Jiménez<sup>1,2</sup>, Alba Piró<sup>1,2</sup>, Victoria Alcaraz-Serrano<sup>3,4</sup>, Giulia Scioscia<sup>5</sup>, Rosanel Amaro<sup>3,4</sup>, Antoni Torres<sup>3,4</sup>, Rosario Menéndez<sup>1,2,4</sup>

1. Pneumology Department, La Fe University and Polytechnic Hospital, Valencia, Spain. 2. La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain. 3. Pneumology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain. 4. Center for Biomedical Research Network in Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona, Spain. 5. Medical and Surgical Sciences Department, Institute of Respiratory Disease, University of Foggia, Foggia, Italy.

**Corresponding Author:**

Dr. Rosario Menéndez

Servicio de Neumología, Hospital Universitario y Politécnico la Fe

Avenida Fernando Abril Martorell 106

46026 Valencia, Spain.

Email: rosmenend@gmail.com

**Author contributions**

R Méndez and R Menéndez conceived the study design. R Méndez, LF, PG, VA, GS, and RA were involved in recruiting the study participants. AM, AP, and AL performed the laboratory analysis of the biological samples. R Méndez, R Menéndez, AM, and AT contributed to the interpretation of the results. R Méndez wrote the manuscript with assistance from R Menéndez, AM, and AT. R Méndez, R Menéndez, AM, AL, LF, PG, AP, VA, GS, RA, and AT reviewed, revised and approved the manuscript for submission. R Méndez and R Menéndez had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Conflict of Interest Disclosures**

All authors declare that they have no conflicts of interest.

**Role of the Funder/Sponsor**

The funding institutions had no role in the design, data collection, data analysis, data interpretation, writing, review, or approval of the manuscript.

**Descriptor:** 10.16 Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis

**Word Count:** 1039

**Funding/Support:** This work was supported by Sociedad Valenciana de Neumología (2018).

**Keywords:** Bronchiectasis, platelet activation, inflammatory response



## Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance

Juana Vallés<sup>1</sup>; Alda Lago<sup>2</sup>; María Teresa Santos<sup>1</sup>; Ana María Latona<sup>1</sup>; José I. Tembl<sup>2</sup>; Juan B. Salom<sup>2,4</sup>; Candela Nieves<sup>2</sup>; Antonio Moscardó<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis, and Vascular Biology Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain; <sup>2</sup>Department of Neurology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Cerebrovascular Research Joint Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain; <sup>4</sup>Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

### Summary

Neutrophil extracellular traps (NETs) are networks of DNA, histones, and proteolytic enzymes produced by activated neutrophils through different mechanisms. NET formation is promoted by activated platelets and can in turn activate platelets, thus favoring thrombotic processes. NETs have been detected in venous and arterial thrombosis, but data in stroke are scarce. The aim of this study was to evaluate NETs in the plasma of patients with acute ischemic stroke and their potential association with baseline clinical characteristics, stroke severity, and one-year clinical outcomes. The study included 243 patients with acute ischemic stroke. Clinical and demographic data and scores of stroke severity (NIHSS and mRS) at onset and discharge were recorded. Markers of NETs (cell-free DNA, nucleosomes, and citrullinated histone 3 (citrH3)), were determined in plasma. Patients were followed-up for 12 months after the ischemic event. NETs were signifi-

cantly elevated in the plasma of patients with acute ischemic stroke when compared to healthy subjects. NETs were increased in patients who were over 65 years of age and in those with a history of atrial fibrillation (AF), cardioembolic stroke, high glucose levels, and severe stroke scores at admission and discharge. In multivariate analysis, elevated levels of citrH3, the most specific marker of NETs, at onset were independently associated with AF and all-cause mortality at one-year follow-up. NETs play a role in the pathophysiology of stroke and are associated with severity and mortality. In conclusion, citrH3 may constitute a useful prognostic marker and therapeutic target in patients with acute stroke.

### Keywords

Stroke, extracellular traps, atrial fibrillation, glucose, Immunity

### Correspondence to:

Antonio Moscardó  
IS La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe  
Ave Fernando Abril Martorell 106  
46026 Valencia, Spain  
Tel: +34 961246638  
E-mail: moscardo\_ant@yu.es

### Financial support:

This work was supported in part by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias Carlos III (PI13/00016), Fondo FEDER, una forma de hacer Europa, Fundación Española de Trombosis y Hemostasia, Sociedad Valenciana de Cardiología, Conselleria Valenciana d'Educació (AC10/016/405), GV and RETICS networks INWCTUS (RD12/0014/0004) and INWCTUS+ (RD16/0019/0008) Instituto de Salud Carlos III.

Received: February 23, 2017  
Accepted after major revision: June 16, 2017  
Epub ahead of print: July 27, 2017

<https://doi.org/10.11607/TH17-02-0130>  
Thromb Haemost 2017; 117: 1919–1929

## Introduction

Stroke is a worldwide leading cause of death, permanent disability and dementia, and the incidence rates are likely to be maintained or even increase in the future due to the aging of the population (1, 2). Treatments for acute ischaemic stroke continue to evolve after the superior value of endovascular thrombectomy was confirmed over systemic thrombolysis. Unfortunately, numerous neuroprotective drugs have failed to show benefit in the treatment of acute ischaemic stroke, making the search for new treatments imperative (2). Substantial evidence supports the importance of thrombotic inflammation as an integral component of ischemic stroke pathophysiology (3). Platelets not only play a central role in the thrombotic process, as demonstrated by the benefit obtained by antiplatelet treatments, but also participate in immunity and in-

flammation (4). However, platelets are not the only cells that participate in these processes. Studies in our laboratory have demonstrated that erythrocytes regulate platelet function at several levels, including the release of platelet IIb/IIIa granules, synthesis of thromboxane A<sub>2</sub>, and activation of IIb/IIIa integrin (5, 6). In addition, platelet-erythrocyte interactions reduce the effect of aspirin in patients with acute stroke (7, 8). Recently, the role of neutrophils in the thrombotic inflammatory process has taken a new direction with the demonstration of the involvement of neutrophil extracellular traps (NETs). During NETs formation, neutrophils release their nuclear content (DNA and histones) and become decorated with proteolytic enzymes (9, 10), which are known for their antimicrobial function and beneficial effects against infections (9, 10). NETs have also been shown to act as a thrombotic inducer, leading to the emerging concept of immunothrombosis, the link between



## LETTER TO THE EDITOR

## The time between venepuncture and blood incubation is critical for serum thromboxane B2 synthesis

María Teresa Santos, Antonio Moscardó, Ana Latome, Belén Cortina, & Juana Vallés

Unit of Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Vascular Biology, Health Research Institute la Fe, Valencia, Spain

### History

Received 12 August 2016; Revised 19 September 2016; Accepted 22 September 2016; Published online 29 November 2016

### Dear Sir,

We have read with interest the recent paper by Brun et al. [1] on differences in serum thromboxane B2 (TXB2) levels in two large clinical studies, the “Boston” [2] and ADRIE studies [3]. The authors found a 10-fold difference in TXB2 levels between the two cohorts and explored whether differences in the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) used for TXB2 quantification and/or differences in individual patient characteristics could account for the large between-study differences in serum TXB2. The authors concluded that the TXB2 differences were not due to these factors [1]. Interestingly, the authors found that the samples’ storage temperature and length of time did not modify the results; there was no difference with regard to storing the samples for several years at  $-80^{\circ}\text{C}$  or one day at room temperature. Moreover, the ELISA results were very similar to those determined using liquid chromatography and mass spectrometry [1]. Importantly, the prognostic values of TXB2 in both studies were conflicting. The Boston study found a significant association between serum TXB2 and major cardiovascular events, which was not confirmed in the ADRIE study [1]. The aim of this letter is to report an unpublished experiment performed some years ago to ascertain the suitability of the serum TXB2 technique for evaluating the effect of aspirin in patients admitted to hospital wards, which may explain the differences in TXB2 levels observed between the two cohorts.

According to the original technique to evaluate serum thromboxane [4], blood has to be rapidly transferred into test tubes without anticoagulant, incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a water bath, and centrifuged; the level of TXB2 synthesis is dependent on the time of incubation reaching a plateau at 30–60 min, and TXB2 is not formed at  $20\text{--}26^{\circ}\text{C}$  [4]. To evaluate whether the serum TXB2 technique was practically valid for patients in the hospital wards, we examined whether leaving the sample for a specific period at room temperature (e.g., for sample transportation) before incubation would modify the results.

For this purpose, venous blood was obtained from aspirin-free normal subjects in a facility with a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  (total  $n = 8$ ; men  $n = 4$ ; mean age = 37 years; age range, 27–60 years) after receiving written consent for the study. The volunteers had not taken any medication for at least 15 days prior to blood collection and all had blood and hemostological parameters within the normal ranges. Blood drawn by a plastic syringe was immediately transferred to 10

glass tubes in aliquots of one milliliter. The first set of duplicated tubes was immediately transferred to the water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  and the rest remained at room temperature for 20, 40, and 60 min. Thereafter, all tubes were incubated for 60 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . At the end of the incubation period, the samples were centrifuged (2,500 g) for 10 min at  $22^{\circ}\text{C}$  and the serum was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the TXB2 enzyme immunoassay was performed (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Duplicated samples were kept for 2 h at room temperature without bath incubation. As shown in Figure 1, serum TXB2 synthesis was remarkably dependent on the time the non-anticoagulated blood remained at room temperature before the 60-min incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ . There was a decrease of 29%, 56%, and 73% of serum TXB2 synthesis after 20, 40, and 60 min at room temperature before incubation compared with samples incubated immediately at  $37^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.0001$ ). When tubes were allowed to coagulate at room temperature for 2 h without any incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , TXB2 synthesis was scarce and/or undetectable (data not shown), in agreement with the initial reporting of the method [4]. Coagulation occurred in all tubes, indicating thrombin generation; however, according to the results, to elicit maximum serum TXB2 production, platelets need to be at a physiological temperature from the time of venepuncture. Although technically simple, the strong association between blood extraction and incubation makes standardization of the serum TXB2 technique difficult when sample transport is required. This logistic factor could have contributed to the serum TXB2 differences in the Boston and ADRIE studies [1], and it may also have influenced other studies with aspirin-treated patients if this aspect was not considered. The results depicted in the figure are in agreement with a recent paper of Petrucci et al. concerning the decreases in serum TXB2 levels due to delay in the incubation of the blood at  $37^{\circ}\text{C}$  [5], being the proportions of time-dependent decreases of serum TXB2 very similar. Interestingly, Petrucci et al. report that their data fit in an exponential decay model rather than in a linear decay with the delay in the blood incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  [5], which supports the critical importance of this technical detail in the evaluation of serum TXB2.

While we agree with the conclusion of Brun et al. in that the serum TXB2 technique is not very practical for patients, we believe that quantification of platelet TXB2 synthesis is the most specific way to evaluate the effect of aspirin in patients with cardiovascular diseases, as cyclooxygenase-1 (COX-1) is the pharmacological target of aspirin [6]. Determination of TXB2 metabolites in plasma or urine is not specific, since it is known that they may derive from extra-platelet sources.

Correspondence: Juana Vallés, Unit of Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Vascular Biology, Health Research Institute La Fe, Torre A, Avd Fernando Abril Martorell 106 Valencia, Spain. E-mail: valles\_ju@iislafe.es





## Platelet function in malignant hematological disorders

Antonio Moscardó<sup>a</sup>, Ana Latorre<sup>a</sup>, María Teresa Santos<sup>a</sup>,  
Santiago Bonnad<sup>b</sup>, and Juana Vallés<sup>a</sup>

### Purpose of review

In this article, we summarize the current knowledge on new roles played by platelets and their interactions with blood components, and their possible implications in malignant hematological disorders.

### Recent findings

Recent reports in the literature are revealing that platelets are important partners in different aspects of physiology and pathophysiology beyond hemostasis and thrombosis, including but not restricted to inflammation, cancer or host defense. Moreover, several studies suggest that platelet interactions with other blood cells could regulate functional and biochemical responses of each other. Finally, platelet alterations in number as well as in function have been observed in different hematological disorders related with the action of treatments.

### Summary

Common complications of leukemia are bleeding and thrombosis, in which the number and activity of platelets undoubtedly play an important role. Probably related with their apparent structural simplicity compared with other hematological cells, the interest in platelets in malignant hematological disorders has been mainly restricted to the determination of the number of circulating platelets. However, different studies have demonstrated that numbers of platelets between 6 and 80 × 10<sup>9</sup> platelets/l are a poor indicator of the risk of bleeding, as this number does not give any information on the functional activity of these platelets.

### Keywords

cell–cell interaction, granule release, platelet receptors, platelets

## INTRODUCTION

The key role played by platelets in protective hemostasis and pathological thrombosis has been largely demonstrated by the relationship of quantitative and/or qualitative disorders of platelets with bleeding and by the clinical benefit observed by the use of antiplatelet drugs in preventing recurring events in patients with cardiovascular disease. However, emerging data suggest that platelets could act as cellular mediators in many other physiological and pathophysiological responses, including safeguarding vessel integrity, immunity, inflammation, cancer and angiogenesis [1,2] (Fig. 1).

Hemorrhagic complications remain a major problem for early death in patients with acute leukemia, particularly in acute promyelocytic leukemia (APL) [3,4]. Therefore, platelet transfusion is a key treatment in these patients [5]. However, new studies have revealed that the efficacy of platelet transfusion is modest, and increases the risk of infection,

inflammation and, unexpectedly, thrombosis [5]. Additionally, the occurrence of thrombosis appears to be more common than previously appreciated in individuals with all types of adult leukemias, including APL [3,4,6,7] as a hypercoagulable state has been observed in these patients [8]. Furthermore, thrombosis is a prevalent problem in myeloproliferative diseases such as essential thrombocythemia and polycythemia vera [6].

The present review aims to summarize the recent advances in platelet function and their

<sup>a</sup>Institute of Health Research and <sup>b</sup>Thrombosis and Haemostasis Unit, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

Correspondence to Antonio Moscardó, IS La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avd Fernando Abril Martorell, 46106 Valencia, Spain. Tel: +34 961248833; e-mail: moscardó\_an@guva.es

Curr Opin Oncol 2015, 27:822–831

DOI: 10.1097/COO.0000000000000237







## The association of thromboxane A<sub>2</sub> receptor with lipid rafts is a determinant for platelet functional responses



A. Moscardó<sup>a,\*</sup>, J. Vallés<sup>b</sup>, A. Latorre<sup>a</sup>, M.T. Santos<sup>b</sup>

<sup>a</sup>IS La Fe, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Research Center, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 1 July 2014

Edited by Veli-Pekka Lehto

#### Keywords:

Lipid raft

Receptor

Signal transduction

Thromboxane A<sub>2</sub>

Thromboxane receptor

### ABSTRACT

We have investigated the presence of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) receptor associated with lipid rafts in human platelets and the regulation of platelet function in response to TXA<sub>2</sub> receptor agonists when lipid rafts are disrupted by cholesterol extraction. Platelet aggregation with TXA<sub>2</sub> analogs U46619 and BOP was almost blunted in cholesterol-depleted platelets, as well as α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> integrin activation and P-selectin exposure. Raft disruption also inhibited TXA<sub>2</sub>-induced cytosolic calcium increase and nucleotide release, ruling out an implication of P2Y<sub>12</sub> receptor. An important proportion of TXA<sub>2</sub> receptor (48%) was colocalized at lipid rafts. The presence of the TXA<sub>2</sub> receptor associated with lipid rafts in platelets is important for functional platelet responses to TXA<sub>2</sub>.

© 2014 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The inhibition of platelet thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) synthesis by aspirin constitutes the first front of antiplatelet treatment in patients with acute cardiovascular disease and, in secondary prevention, to reduce the risk of a new event among patients at high risk of occlusive vascular events [1]. TXA<sub>2</sub> is produced by activated platelets and acts by reinforcing platelet activation and by inducing the recruitment of new platelets to the growing thrombus. In addition, TXA<sub>2</sub> is a powerful vasoconstrictor. Actions of TXA<sub>2</sub> on platelets are mediated by the activation of TXA<sub>2</sub> receptor in the membrane of cells. The TXA<sub>2</sub> receptor belongs to the superfamily of seven transmembrane-domain receptors. In platelets, two isoforms of TXA<sub>2</sub> receptor (TP<sub>α</sub> and TP<sub>β</sub>) have been identified [2]. Both the TP<sub>α</sub> and TP<sub>β</sub> subtypes mediate the stimulation of phospholipase C and an increase in intracellular concentrations of inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol. The formation of inositol 1,4,5-triphosphate induces an increase in the cytosolic concentration of Ca<sup>2+</sup>, whereas the release of diacylglycerol activates PKC [2]. These actions of the TXA<sub>2</sub> receptors in platelets are mediated by the association of the receptor to G<sub>q</sub> and G<sub>13</sub> proteins [3].

The cell membrane microdomains called lipid rafts are sphingolipid and cholesterol-based structures consisting of very small domains (20–50 nm) of tightly packed lipids displaying lateral mobility [4]. Lipid raft formation should therefore be facilitated in membranes rich in cholesterol and sphingolipids that promote the formation of liquid-ordered domains in the presence of cholesterol [5]. Interestingly, there is a relatively high amount of sphingomyelin in human platelets plasma membrane as compared to other cell types, suggesting a lipid composition in favor of lipid raft formation in these cells [6]. Several previous studies have suggested that lipid rafts are highly dynamic platelet membrane structures involved in critical signaling mechanisms [4,7]. It has been reported that the presence of different proteins associated with lipid rafts, including membrane receptors (CD36, GPR, GPVI, P2Y<sub>12</sub>), signal transduction partners (LAT, Src, G proteins) and enzymes (PKC, PLCγ<sub>2</sub>) [6]. However, to the best of our knowledge, the presence of TXA<sub>2</sub> receptor in lipid rafts in platelets has not been previously described, although in other cell types the localization of TXA<sub>2</sub> receptors in lipid rafts have already been demonstrated [8,9].

The aim of this study was to explore the association of the TXA<sub>2</sub> receptor with lipid rafts in human platelets and the functional implications of this location for the platelet responses to TXA<sub>2</sub>. Our results demonstrate, for the first time, the importance of lipid rafts for TXA<sub>2</sub>-induced platelet responses, a process related with the presence of a fraction of TXA<sub>2</sub> receptors associated with lipid rafts.

\* Corresponding author. Address: IS La Fe, Torre A, Planta 5 laboratorio 5.17, Hospital Universitario La Fe, Avd. Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain. Fax: +34 96349 46 20.

E-mail address: moscardo\_rob@islafe.es (A. Moscardó).





## Serine/threonine phosphatases regulate platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor outside-in signaling mechanisms and clot retraction

Antonio Moscardó<sup>a,\*</sup>, María Teresa Santos<sup>a</sup>, Ana Latorre<sup>a</sup>, Isabel Madrid<sup>b</sup>, Juana Vallés<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IIS La Fe and Research Center, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Institute Care IIIQ, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 March 2013

Accepted 20 September 2013

#### Keywords:

Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$

FAK

Outside-in signaling

Platelet

PDFA

### ABSTRACT

**Aims:** We studied the role of serine/threonine phosphatases (PSTPs) on  $\alpha_{IIb}\beta_3$  signaling and the potential selectivity of the level of PSTP inhibition with okadaic acid (OA) on  $\alpha_{IIb}\beta_3$  signaling for regulation of platelet aggregation and clot retraction.

**Main methods:** We used washed platelets from normal donors and OA as inhibitor of PSTPs. Clot retraction was induced by 1 U/ml of thrombin. Incorporated cytoskeleton was isolated from Triton X-100 lysed platelets. The presence of proteins incorporated to the cytoskeleton was assayed by immunoblotting with specific antibodies.

**Key findings:** We found that both 100 and 500 nM OA blocked platelet mediated clot retraction. In contrast, only 500 nM OA inhibited thrombin-induced inside-out  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation, platelet aggregation, and cytoskeletal reorganization. Among markers of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  outside-in signaling, 500 nM OA inhibited the incorporation to the cytoskeleton of *src*, *shc*, and FAK (Focal Adhesion Kinase) tyrosine kinases and the incorporation and phosphorylation at Tyr<sup>397</sup> of the  $\beta_3$  chain of  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , while 100 nM OA only inhibited the FAK translocation and its tyrosine phosphorylation.

**Significance:** The level of inhibition of PSTPs by low or high OA concentration (100 and 500 nM, respectively) in intact whole cells differentially regulates platelet aggregation and integrin signaling, but have a common effect in blocking clot retraction. The latter may be associated with the presence of phosphorylated FAK in the cytoskeleton. This study reveals a novel target for anti-platelet treatment to block clot retraction without affecting the platelet hemostatic function by a partial inhibition of PSTPs.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

The  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin receptor is essential for platelet aggregation and clot retraction (Coller and Shattil, 2008). Agonist stimulation leads platelets to regulate integrin affinity ("activation") through inside-out signaling, thus allowing binding to its ligands (fibrinogen, vWF (von Willebrand Factor), and other proteins containing RGD (Arg-Gly-Asp)-like sequences) and platelet aggregation (Shattil, 2009). Ligand binding becomes progressively irreversible and promotes integrin clustering and further conformational changes that are transmitted to its cytoplasmic tails (outside-in signaling) (Shattil et al., 1998). This results in the recruitment and/or activation of enzymes, adaptors, and effectors to form integrin-based signaling complexes. These include formation of a complex with tyrosine kinases (*src*, *shc*, or FAK) and cytoskeletal proteins (talin, gelsolin, etc.), where tyrosine phosphorylated proteins may serve as hooks to form a cytoskeletal structure (Frame et al., 2010; Pawson and Scott, 1997; Santos et al., 2000). These outside-in reactions with

origin in the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin bound to fibrinogen are required for maximal secretory, proaggregant, and clot retraction responses of platelets (Shattil, 2009).

A role for tyrosine phosphorylation-dephosphorylation in integrin activation is suggested by observations that tyrosine kinase inhibitors partially block integrin activation and platelet aggregation (Santos et al., 2000), whereas inhibitors of protein tyrosine phosphatases trigger platelet activation (Moscardó et al., 2006). However, less information is available about the role of serine/threonine phosphatases (PSTPs) in the signaling mechanisms of  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . PP1 and PP2A are the most prominent PSTPs present in platelets (Lerea, 1992). Knowledge about the pathways of participation of PP1/PP2A in integrin signaling is very scarce (Alcahaz et al., 2013; Gushkiy et al., 2008; Wang et al., 2008), although several studies report that inhibition of PP1/PP2A with high concentrations of okadaic acid (OA), strongly reduced platelet aggregation (Lerea, 1991; Levy-Torres et al., 1997; Moscardó et al., 2006). However, no data is presently available concerning the participation of PP1/PP2A in clot retraction.

An interesting aspect of the PSTP participation in platelet function is the interconnection between pathways of protein phosphorylation in tyrosine and/or serine/threonine residues (Atanaculic et al., 1996; Moscardó et al., 2006). The inhibition of PSTPs with OA 500 nM inhibits tyrosine phosphorylation of some platelet proteins (Moscardó et al., 2006).

**Abbreviation:** PSTPs, protein serine/threonine phosphatase; OA, okadaic acid; FAK, Focal adhesion kinase.

\* Corresponding author at: IIS La Fe, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avd Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel: +34 963262000x20570; fax: +34 96372018.

E-mail address: moscardo\_antonio@islafe.es (A. Moscardó).

0026-2658 – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.  
http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.020



## ORIGINAL ARTICLE

The administration of a loading dose of aspirin to patients presenting with acute myocardial infarction while receiving chronic aspirin treatment reduces thromboxane A<sub>2</sub>-dependent platelet reactivityMaria Teresa Santos<sup>1\*</sup>, Isabel Madrid<sup>2</sup>, Antonio Moscardó<sup>1</sup>, Ana M. Latore<sup>1</sup>, Juan Bonastre<sup>2</sup>, Miguel Ruano<sup>2</sup>, & Juana Valles<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Research Center and <sup>2</sup>Intensive-Care Unit, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

## Abstract

The optimal dose of aspirin for patients presenting with acute myocardial infarction (AMI) while receiving chronic aspirin therapy has not been clearly established. We evaluated whether continued treatment with 100 mg of aspirin or a loading dose (200–500 mg) influences thromboxane A<sub>2</sub> (TX) suppression or platelet reactivity. Sixty-four consecutive patients with AMI and 98 healthy subjects (32 aspirin-free and 16 receiving 100 mg daily for a week) were evaluated. Treatment was at the discretion of the attending physician. Collagen (1 µg/ml)-induced TX synthesis, <sup>14</sup>C-serotonin-release, platelet aggregation, and the PFA-100 assay were evaluated. The platelet TX synthesis of patients receiving a loading dose of aspirin was 50-fold lower than that of patients receiving 100 mg of aspirin ( $p < 0.005$ ). This was associated with marked reductions in <sup>14</sup>C-serotonin-release and arachidonic-acid-induced aggregation and an increase in the PFA-100 closure time ( $p < 0.01$ ). Categorization of patients according to their TX synthesis (<95% or ≥95% inhibition vs. healthy aspirin-free subjects) revealed that 8% of the patients treated with loading doses had a poor response (<95% inhibition) vs. 53% of those treated with 100 mg ( $p < 0.001$ ). Patients with lower TX inhibition had higher serum NT-Pro-BNP ( $p < 0.005$ ), a marker of poor left ventricular systolic function. Administration of a loading dose of aspirin to patients with AMI during existing chronic aspirin treatment induced greater reductions in platelet TX synthesis and TX-dependent platelet reactivity than the continued treatment alone.

## Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) results from atherosclerotic plaque rupture or erosion, which exposes the circulating blood to a thrombogenic environment that leads to an acute thrombosis in a coronary vessel. Platelets play an important role in this phenomenon and in its clinical recurrence [1]. Therefore, antiplatelet therapy with aspirin and P2Y<sub>12</sub> receptor blockers is a key factor in the treatment of these patients. The best characterized effect of aspirin on platelets is the inhibition of cyclooxygenase 1 (COX1), leading to the inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> (TX) synthesis [1]. TX is a platelet activator and vasoconstrictor that amplifies the platelet responses to other agonists [1] and contributes to platelet recruitment [2, 3]. Aspirin treatment in patients with acute myocardial infarction reduces the risk of death from vascular causes by 23% and the risk of re-infarction by 42% [4]. However, some patients experience recurrent thrombotic episodes despite aspirin treatment. The potential contribution of platelet reactivity insufficiently inhibited by antiplatelet drugs should be considered a risk factor for recurrence [5–8].

A permanent blockade of platelet TX is advisable to ensure aspirin-induced cardio-protection [9], which is thought to be achieved with a wide range of therapeutic doses of aspirin. However, the most specific test of the effect of aspirin on platelets [10, 11], the evaluation of platelet TX synthesis, is not performed frequently in these patients [5, 6, 12]. Data on platelet TX synthesis in aspirin-treated patients with AMI are particularly scarce. Our previous data [13–15] and those of others [16] indicated that platelet TX suppression is incomplete after aspirin treatment in a significant proportion of patients with AMI, and that this is associated with an increase in myocardial necrosis [13].

The current guidelines for the management of patients with AMI recommend that the treatment of aspirin-naïve patients with AMI should be initiated with a loading dose of 162–325 mg of aspirin, followed by lower daily doses (75–100 mg) [17]. However, no clear recommendations are available concerning the treatment of patients who present with AMI while chronically treated with low-dose aspirin.

In the present observational study, we evaluated platelet TX synthesis in patients treated for AMI while receiving chronic aspirin treatment – those either who continued their treatment with a low daily dose of aspirin (100 mg) or who received a higher loading dose (200–500 mg) at their physician's discretion. We also examined the impact of the level of platelet TX inhibition by aspirin (greater or lower than 95% vs. an aspirin-free population

## Keywords

Chronic aspirin, left ventricular ejection fraction, NT-pro-BNP, PFA-100, platelet function, serotonin release, thromboxane A<sub>2</sub>

## History

Received 4 March 2013

Revised 14 June 2013

Accepted 14 June 2013

Published online 2 August 2013

\*MT Santos and J Valles contributed equally to the study  
Correspondence: Maria T. Santos, PhD, Research Center University Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain. Tel: +34 96 3862997. Fax: +34 96 1973018. E-mail: santos\_mt@uv.es





## Cardiovascular pharmacology

## Improvement of the circulatory function partially accounts for the neuroprotective action of the phytoestrogen genistein in experimental ischemic stroke



Belén Cortina<sup>a</sup>, Germán Torregrosa<sup>a,c\*</sup>, María Castelló-Ruiz<sup>a,c</sup>, María C. Burguete<sup>c</sup>, Antonio Moscardó<sup>b</sup>, Ana Latorre<sup>a</sup>, Juan B. Salom<sup>a,c</sup>, Juana Vallés<sup>b</sup>, María T. Santos<sup>b</sup>, Enrique Alborch<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Fe, Unidad Mixta de Investigación Cardiovascular, Centro de Investigación, Av. Compañar 21, 46009-Valencia, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Fe, Grupo de Investigación en Hemostasia, Trombosis, Arterioesclerosis y Biología Vascular, Centro de Investigación, Av. Compañar 21, 46009-Valencia, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Av. Blasco Ibáñez 15, 46100-Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 October 2012

Received in revised form

6 February 2013

Accepted 7 February 2013

Available online 24 February 2013

## Keywords:

Genistein

Isolavone

Phytoestrogen

Platelet

Stroke

Thromboxane A<sub>2</sub>

## ABSTRACT

We tested the hypothesis that the phytoestrogen genistein protects the brain against ischemic stroke by improving the circulatory function in terms of reduced production of thromboxane A<sub>2</sub> and leukocyte-platelet aggregates, and of preserved vascular reactivity. Ischemia-reperfusion (90 min–3 days, intraluminal filament) was induced in male Wistar rats, and functional score and cerebral infarct volume were the end points examined. Genistein (10 mg/kg/day) or vehicle (β-cyclodextrin) was administered at 30 min after ischemia or sham-operation. Production of thromboxane A<sub>2</sub> and leukocyte-platelet aggregates, as well as reactivity of carotid artery to U-46619 (thromboxane A<sub>2</sub> analogue) and to platelet releasate was measured. At 3 days post-ischemia, both improvement in the functional examination and reduction in the total infarct volume were shown in the ischemic genistein-treated group. Genistein significantly reverted both the increased thromboxane A<sub>2</sub> concentration and the increased leukocyte-platelet aggregates production found in samples from the ischemic vehicle-treated group. Both U-46619 and platelet releasate elicited contractions of the carotid artery, which were significantly lower in the ischemic vehicle-treated group. Genistein significantly restored both the decreased U-46619- and the decreased platelet releasate-elicited contractile responses. In conclusion, genistein protects the brain against an ischemia-reperfusion challenge, at least in part, by its beneficial effects on the circulatory function.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

About one million strokes occur each year in the European Union, and the total incidence is projected to increase over the next two decades. Stroke is the second cause of death after coronary heart disease and, may be more importantly, the first cause of chronic disability in the European Union (Moiris et al., 2007). In spite of the myriad of potential targets identified during the study of the pathophysiology of stroke, only thrombolysis with the tissue-plasminogen activator has been approved by the American Food and Drug Administration. Unfortunately, its use is restricted to a low percentage of patients and, moreover, it can entail serious detrimental effects (neurotoxicity, reperfusion

injury) (Stankowski and Gupta, 2011), so that the need for effective neuroprotective agents still remains.

Platelets play a crucial role in the atherothrombotic events leading to stroke, and changes in platelet function have been reported to occur in the acute phase of ischemia (Frankis et al., 2010). Antiplatelet drugs, particularly aspirin, are used nowadays to treat acute arterial thrombotic events. Aspirin inhibits cyclooxygenase-1 and subsequent synthesis of thromboxane A<sub>2</sub>. This eicosanoid contributes to the platelet recruitment into the forming thrombus as we reported in aspirin-treated healthy subjects (Valles et al., 1991), as well as in patients with vascular diseases (Santos et al., 2008). However, conventional antiplatelet treatments reduce the risk of serious vascular events only by about 25% (Anti-thrombotic Trialists' Collaboration, 2002). Therefore, a new generation of safer and more effective anti-thrombotic drugs is needed. A promising alternative is soy-derived isolavones, a group of chemicals structurally and functionally related to the ovarian hormone 17β-estradiol (hence the term "phytoestrogens"), which have been repeatedly shown to inhibit platelet

\* Corresponding author at: Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Compañar 21, 46009-Valencia, Spain. Tel.: +34 963 9627 97; fax: +34 96 1973 018.

E-mail address: torregrosa\_germ@va.es (G. Torregrosa).







## Regular Article

Reduction of platelet cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activity by atorvastatin and simvastatin: Biochemical regulatory mechanismsAntonio Moscardó <sup>a,\*</sup>, Juana Vallés <sup>a</sup>, Ana Latorre <sup>a</sup>, Isabel Madrid <sup>b</sup>, María Teresa Santos <sup>a</sup><sup>a</sup> Research Center University Hospital La Fe, Valencia, Spain<sup>b</sup> Innovative Care Unit University Hospital La Fe, Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 October 2012

Received in revised form 18 December 2012

Accepted 2 January 2013

Available online 24 January 2013

## Keywords:

cyclic  
thromboxane A<sub>2</sub>  
platelets  
aspirin  
cPLA<sub>2</sub>  
MAPKs

## ABSTRACT

Statins have demonstrated effects beyond reducing cholesterol level that may contribute to their clinical benefit, including effects on platelet biosynthesis and function.

**Objective:** To explore and compare the antiplatelet effect of two lipophilic statins (atorvastatin and simvastatin) and one hydrophilic statin (pravastatin) concerning: a) collagen-induced platelet aggregation and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) synthesis; b) the additive effect of statins on TXA<sub>2</sub> synthesis in platelets treated with a submaximally effective concentration of aspirin; and c) the biochemical mechanisms involved.**Methods and Results:** Washed human platelets were incubated with statins (1–20 μM), and stimulated with collagen (1 μg/ml) or arachidonic acid (AA) (200 μM) and TXB<sub>2</sub> was quantified by ELISA. Incubation with simvastatin or atorvastatin reduced (36.2% and 31.0%, respectively) collagen-induced TXB<sub>2</sub> synthesis (*p* < 0.05) and platelet aggregation (*p* < 0.001), whereas pravastatin had no effects. Simultaneous incubation with a submaximally effective concentration of aspirin (1 μM) and atorvastatin or simvastatin significantly increased the inhibition of TXB<sub>2</sub> synthesis by aspirin by 4.4- and 4.1-fold, respectively. Statins did not affect AA-induced TXB<sub>2</sub> synthesis, excluding an effect on COX-1/TXA<sub>2</sub> synthase activation. Atorvastatin and simvastatin concentration-dependently inhibited the collagen-induced increase in cytosolic calcium and the kinetics of cPLA<sub>2</sub> phosphorylation. Lipophilic statins reduced phosphorylation of both ERK1/2 and p38 MAPK, which regulate cPLA<sub>2</sub> phosphorylation and calcium movement.**Conclusion:** We report for the first time a direct down-regulation by atorvastatin and simvastatin of platelet cPLA<sub>2</sub> activity through effects on calcium and MAPK, which reduce collagen-induced TXA<sub>2</sub> synthesis. These mechanisms might contribute to their beneficial effects, even in aspirin-treated patients.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Statins inhibit cholesterol biosynthesis by downregulating of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. Statin treatment has beneficial effects in the primary and secondary prevention of coronary artery disease [1–4]. However, the clinical benefits observed with statin treatment appear to be greater than those expected from a reduction in cholesterol levels alone, suggesting effects of these drugs beyond their cholesterol-lowering activity [5,6].

Hypercholesterolemia is associated with increased platelet activation [7] and TXA<sub>2</sub> synthesis [8]. Schorr et al. [9] was the first to report that statins reduce platelet TXA<sub>2</sub> production in a small group of aspirin-free patients with hypercholesterolemia. Later, other investigators reported that statins reduce the levels of TXB<sub>2</sub> urinary metabolites [8,10,11]. This was attributed to direct or indirect effects of the reduction in cholesterol level by statins [12].

We found recently that dual treatment with aspirin and atorvastatin significantly reduced the proportion of patients with acute coronary syndrome (ACS) with an insufficient inhibition of platelet TXA<sub>2</sub> synthesis when compared with patients treated with aspirin alone [13]. This was observed both in patients treated chronically with atorvastatin before the event and in those treated acutely with the statin on admission. The latter suggested a direct cholesterol-independent effect of atorvastatin on platelet reactivity, particularly on the biochemical pathways of TXA<sub>2</sub> synthesis.

Eicosanoid synthesis is initiated by the release of arachidonic acid (AA) from membrane phospholipids by the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). AA in its free form is metabolized rapidly by constitutive cyclooxygenase-1 (COX-1)/TXA<sub>2</sub> synthase to TXB<sub>2</sub>, the main metabolite of this pathway, and prostaglandins [14]. Activation of cPLA<sub>2</sub> is induced by receptor-mediated intracellular signals, including the increase in cytosolic calcium movements produced by platelet activation, which is necessary for the binding of the enzyme to the plasma membrane [15]. cPLA<sub>2</sub> is also activated by phosphorylation at Ser<sup>662</sup> and Ser<sup>677</sup> residues by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38 MAPK and ERK1/2; phosphorylation increases the catalytic enzyme

\* Corresponding author at: Research Center University Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, 46209 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 1602787; fax: +34 96 1670108.  
E-mail address: moscardo\_jmd@vsaia (A. Moscardó).

