



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

MIGRACIÓN TRANS-ENDOTELIAL DE PLAQUETAS

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: LUCÍA PAZ FUENZALIDA MUÑOZ
PROFESOR GUÍA: Dr. TM RODRIGO ERNESTO MOORE CARRASCO**

**TALCA-CHILE
2022**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

Dedicatoria

A mis hermanos y en especial a mi madre, Mónica por su gran amor y apoyo incondicional, que en más de una ocasión me dio la fuerza necesaria para seguir y afrontar las adversidades, por su ejemplo de fe y confianza, que me ha permitido volar y soñar más alto.
Este escrito es una pequeña muestra de amor y agradecimiento hacia ella.

Agradecimientos

Al docente Dr. TM Rodrigo Moore Carrasco por su gran enseñanza y dedicación como profesor guía de esta memoria, que me permitió lograr el desarrollo de este trabajo, donde destacó su humanidad y carisma que en más de una oportunidad me sacó una sonrisa y me brindó el apoyo en los momentos difíciles.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	10
1. OBJETIVO GENERAL	10
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	11
MARCO TEÓRICO	12
1. FISIOLÓGÍA PLAQUETARIA	12
1.1 Plaquetas	12
1.2 Gránulos α y densos	13
2. FISIOLÓGÍA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES	16
2.1 Endotelio vascular	16
2.2 Actividad antitrombótica de las células endoteliales	17
3. FISIOPATOLOGÍA PLAQUETARIA	19
3.1 Interacción plaquetaria con endotelio	19
3.2 Activación plaquetaria	21
3.2.1 Implicación de la GP IIb/IIIa en la activación plaquetaria	23
3.2.2 Calcio en la activación plaquetaria	25
3.2.3 Secreción de los gránulos plaquetarios	27
3.3 Amplificación de la activación plaquetaria	30
3.4 Interacción plaqueta-leucocito-células endoteliales activadas	33
4. LA FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA ATROSCLEROSIS	36
4.1 Aterosclerosis	36

4.2 La influencia de las plaquetas en la estabilidad de la placa aterosclerótica	38
5. PROCESO DE MIGRACIÓN TRANS-ENDOTELIAL PLAQUETARIO	41
6. PLAQUETA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN ATEROSCLEROSIS	44
6.1 Inhibidores de la ciclooxigenasa	45
6.2 Inhibidor del tromboxano	46
6.3 Antagonista del receptor de la trombina	47
6.4 Antagonista del receptor del ADP	47
6.5 Antagonista de la GP IIb/IIIa	49
7. PERSPECTIVAS FUTURAS: NUEVOS CONCEPTOS FARMACOLÓGICOS	52
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de los gránulos α plaquetarios	15
Tabla 2. Contenido de los gránulos densos plaquetarios	16
Tabla 3. Agonistas, ligandos y receptores importantes para la función plaquetaria	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad antitrombótica de las Células endoteliales	18
Figura 2. Interacción plaquetaria con endotelio activado	21
Figura 3. Activación de la integrina α IIb β 3 plaquetaria	24
Figura 4. Mecanismo del calcio en la activación plaquetaria	27
Figura 5. Exocitosis de gránulos plaquetarios mediada por SNARE	29
Figura 6. Amplificación de las señales tras la activación plaquetaria	32
Figura 7. Interacción del complejo y transmigración del monocito	34
Figura 8. Interacción monocito-plaqueta- CE activadas	35
Figura 9. Las plaquetas participan en la aterosclerosis en condiciones de hiperlipidemia	40
Figura 10. Procesos que permiten la migración plaquetaria	42
Figura 11. Mecanismo de acción de los fármacos antiplaquetarios	52
Figura 12. Biosíntesis y receptores de prostaglandina E ₂	56

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares se deben a menudo a la aterosclerosis una afección que subyace a los eventos aterotrombóticos, donde las plaquetas juegan un papel esencial al participar en el origen y en las primeras etapas de la lesión aterosclerótica. Recientemente se ha observado que la hiperactivación plaquetaria, genera un microambiente proinflamatorio y protrombótico que le permite actuar como moduladoras de la inflamación, al interactuar fácilmente con las células inmunes innatas y adaptativas, principalmente con monocitos, el cuales es clave para formación y progresión de la placa. Se ha descrito que en este proceso también está implicada la plaqueta, puesto que contiene la maquinaria esencial para realizar la migración trans-endotelial de manera autónoma, donde actúa como moduladora de la composición de la capa íntima de los vasos sanguíneos, estimulando una mayor migración y transformación de macrófagos a células espumosas, contribuyendo directamente en la propagación de la placa aterosclerótica, convirtiéndola en una diana terapéutica importante de dilucidar. Esta revisión está enfocada en proveer una descripción de la maquinaria molecular, el componente secretor y las interacciones plaquetarias, involucradas en la migración trans-endotelial en la aterosclerosis, con un enfoque hacia nuevas estrategias de tratamiento.

Palabras claves: plaquetas, aterosclerosis, trans-endotelial, placa aterosclerótica, células endoteliales.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un foco de estudio de gran interés, debido a que representan una de las principales causas de muertes en el mundo, y su incidencia cada año va en aumento. Si bien las ECV son un grupo heterogéneo de padecimientos que afectan por separado al corazón y a los vasos sanguíneos, estas engloban a la aterosclerosis, una enfermedad crónica, generalizada y progresiva, que afecta sobre todo a las arterias de mediano tamaño, que se caracteriza por la presencia de interacciones complejas entre factores circulantes y varios tipos celulares, tanto residentes como reclutadas, en las paredes de los vasos, incluyendo monocitos y plaquetas (1). Estas interacciones comienzan con el cambio en el perfil de las moléculas de adhesión presentes en el endotelio, si bien en su rol canónico las plaquetas se unen a la matriz extracelular para actuar como un tapón, en condiciones de daño endotelial sin pérdida de la integridad del vaso, las plaquetas se pueden unir a las células endoteliales (CE) activadas, favoreciendo el desarrollo de la placa de ateroma, la cual contempla diversos eventos importantes, uno de ellos y que actualmente cobra mayor relevancia, son los eventos inflamatorios crónicos que conducen finalmente a la formación de lesiones ateroscleróticas.

Las plaquetas son sorprendentemente multifuncionales, ya que no solo cumplen el rol de vigilar constantemente la integridad de la vasculatura, sino que además están involucradas en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos reconociéndose ampliamente su papel y contribución en las ECV (2). En este sentido hoy sabemos que las plaquetas son capaces de secretar al medio una amplia gama de moléculas inflamatorias como quimiocinas, y citoquinas, que participan en la regulación de las primeras etapas de la aterosclerosis, mediando las interacciones con los leucocitos y el endotelio. Estas interacciones conducen al reclutamiento de más leucocitos hacia la pared vascular, permitiendo así el inicio del proceso de extravasación de las células inmunes circulantes. Por otra parte, los lípidos extracelulares como LDL y modificaciones de estos, al ser fagocitados por macrófagos estimulan su

transformación en células de espuma, que provocan un desplazamiento y reducción de la matriz intercelular estructural, lo cual es clave en el proceso aterotrombótico (3).

Diferentes investigaciones han dado a conocer que las plaquetas contienen todos los elementos contráctiles necesarios para poder migrar hacia sitios donde hay presencia de lesión e inflamación vascular, con el fin de contribuir en la eliminación bacteriana y la activación de neutrófilos. Pese a que esta capacidad solo se le otorgarse a células nucleadas, se ha demostrado que estos fragmentos citoplasmáticos anucleados migran, lo cual indica que la maquinaria esencial encargada de impulsar la movilidad celular se concentra en el citoplasma y no depende necesariamente de un núcleo (4). Razón por la cual se vuelve interesante el poder esclarecer cuales son las interacciones moleculares que se generan entre las plaquetas, CE activadas y los monocitos, junto al componente inflamatorio y secretor liberado a raíz de esta interacción, que está implicado en potenciar la migración trans-endotelial plaquetaria. Convirtiéndolo en una diana importante de dilucidar, que se abordara a lo largo de esta revisión bibliográfica con el objetivo de poder otorgar información fidedigna y relevante para la implementación de estrategias de intervención farmacológicas más precisas, que inhiban selectivamente las vías más relevantes del proceso de desarrollo y la progresión de la aterosclerosis.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Comprender la trans migración endotelial de las plaquetas en el contexto aterosclerótico.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Revisar las principales interacciones entre las plaquetas, monocitos y el endotelio.

2.2 Conocer el componente inflamatorio y secretor de las plaquetas y como estos contribuyen en el proceso aterosclerótico.

2.3 Analizar a la plaqueta como una posible diana terapéutica en el proceso aterosclerótico.

METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

La presente memoria es una revisión bibliográfica que se elaboró mediante una investigación documental, de lectura y registro en base a lo planteado en los objetivos. Por lo que, para el correcto desarrollo y selección de la información contenida en este texto, se definieron aspectos claves en la búsqueda de artículos en una base datos que asegurara la calidad de la información obtenida, razón por la cual se optó por bibliotecas digitales, revistas y páginas web, de sitios populares especializados en literatura médica y relacionados con el área de salud, los cuales en su mayoría son de libre acceso, excluyendo la información de fuentes poco confiables, destacando: PubMed, un motor de búsqueda que concentra más del 80% de las publicaciones relacionadas y especializada en temas de ciencia y salud que tiene su base en MEDLINE; Google académico, buscador web que permitió generar un enfoque centralizado en asuntos relacionado con el ámbito científico-académico; Elsevier, una editorial con un gran contenido de libros de medicina y literatura científica del mundo; y revista como: Cell, que presenta artículos de investigación original, escritos por los científicos más destacados a nivel mundial con alto prestigio e impacto; la revista Española de Cardiología, dedicada a las enfermedades cardiovasculares; y Journal of Thrombosis and Haemostasis (JTH), enfocada en trombosis, trastornos hemorrágicos y biología vascular. En estos sitios web para realizar la búsqueda se escogieron palabras claves, como: platelets, endothelial cells, trans-endothelial, atherosclerotic plaque y atherosclerosis, las cuales fueron seleccionada en inglés, puesto que la mayoría de la información más novedosa se encuentra en este idioma, además se determinó un rango de años de búsqueda, que en su mayoría, va desde el 2005 hasta el 2022, tras observar que dentro de estos se registraban los mayores pick de artículos de interés asociados a las palabras claves. De este modo se logró filtrar la información no deseada y obtener solo la relacionada con esta temática para el cumplimiento y desarrollo de los objetivos.

MARCO TEÓRICO

1. FISIOLÓGÍA PLAQUETARIA

1.1 Plaquetas

Las plaquetas son células anucleadas, que derivan de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos en la médula ósea, son pequeñas y de forma discoide que circulan dentro del torrente sanguíneo, con dimensiones de aproximadamente 2,0 a 4,0 por 0,5 μm y un volumen medio de 7 a 11 fl, son el segundo corpúsculo más numeroso de la sangre, entre 150 y $450 \times 10^9 / \text{l}$, un adulto sano produce cada día una media de alrededor de 1×10^{11} plaquetas (1). En condiciones normales se acumulan donde el endotelio está disfuncional e inician la formación del trombo, además estas pueden circular durante 7 a 10 días aproximadamente hasta ser removidas principalmente por bazo (5). Pese a no ser consideradas células debido a la falta de núcleo, estas si son complejas a nivel estructural, metabólica y funcionalmente, ya que su ultraestructura comprende, una zona periférica dotada de glicocálix, una bicapa de fosfolípidos que contienen varios receptores de superficie que ayudan en la señalización y el tráfico intracelular (6), un citoesqueleto de actina, junto con un esqueleto membranoso basado en espectrina y una banda periférica de microtúbulos, que están encargado de darle la forma a las plaquetas, y diferentes sistemas como el tubular denso y las organelas. Asimismo, estas también carecen de ADN genómico, pero contienen ARN mensajero derivado de sus células progenitoras, junto con la maquinaria de traducción necesaria para la síntesis de proteínas. Las mitocondrias que estas presentan están involucradas en la formación de adenosín trifosfato (ATP) a través de un proceso metabólico denominado fosforilación oxidativa, el cual regula la función plaquetaria tanto en estado estacionario como durante la activación plaquetaria (7) y la señalización intracelular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (6). Las plaquetas también están repletas de gránulos secretores que son cruciales para su función

normal, de los cuales destacan tres, que funcionan como almacenamiento de moléculas biológicamente activas, siendo el más abundantes los gránulos α , seguidos de los gránulos densos y los gránulos lisosomales (8).

1.2 Gránulos α y densos

La síntesis y el empaquetamiento de los gránulos α y densos plaquetarios se produce principalmente en la etapa temprana de los megacariocitos y se plantea que tanto los gránulos α como los densos pueden madurar a partir de los cuerpos multivesiculares (MVB) (9). Estos gránulos intracelulares que presentan luego las plaquetas les permiten poder comunicarse entre si y con otras células, a través de una variedad de sustancias bioactivas que son expuestas o secretadas tras la fusión con la membrana plaquetaria bajo diferentes eventos de estimulación (10), que permiten vaciar su contenido hacia el exterior, el cual actúa de forma paracrina y/o autocrina retroalimentando y amplificando el proceso de activación plaquetaria, tanto en número como en magnitud (11).

Se ha visto que la secreción de los gránulos α forma parte importante de la hemostasia primaria, la coagulación, inflamación, quimiotaxis, activación y adhesión plaquetaria, ya que en su interior almacenan proteínas de adhesión e integrales de membrana, factores de coagulación y sus inhibidores, proteasas, quimiocinas, entre otros (Tabla 1) (12). Dentro de este grupo destacan: el factor von willebrand (VWF) en su forma más potente, es decir, como multímeros de alto peso molecular, que junto al fibrinógeno, participan reforzando las interacciones de adhesión de las plaquetas a las CE; y las quimiocinas, como el CXCL4 o factor plaquetario 4 (PF4) y CCL5 (RANTES) (11). PF4 es una proteína cargada positivamente de unión a glucosaminoglicanos, que además de tener un papel en la hemostasia también es una proteína quimiotáctica para leucocitos, donde ejerce una actividad inmunorreguladora involucrada en una variedad de estados patológicos, promoviendo la diferenciación de monocitos a macrófagos, acelerando la aterogénesis al causar inflamación vascular y promover la retención de lipoproteínas en la pared vascular, lo

que contribuye a la aterosclerosis (13). Mientras que RANTES se encarga de recluta monocitos en el endotelio inflamado de una manera dependiente de la P-selectina, además interactuar con la superficie endotelial en presencia de interleucinas 1 beta ($IL-1\beta$), una citocina producida a nivel citoplasmático (14) que es liberada como micropartículas inmovilizante en el endotelio activado, donde actúa como una señal para la expresión de más moléculas adhesivas por parte de las CE, a través de la activación de NF- κ B, necesario para la transcripción de los genes inflamatorios como las proteínas quimiotácticas de monocitos 1 (MCP-1) y las moléculas de adherencia intercelular (ICAM-1), los cuales promueven el reclutamiento de monocitos hacia el tejido inflamado, de igual forma regulan la liberación de IL-6 e IL-8 citocinas proinflamatorias de las CE (13).

En cambio los gránulos densos cumplen un papel predominante en la activación paracrina, ya que contienen cationes, fosfatos, nucleótidos, entre otros (Tabla 2), destacando el difosfato de adenosina (ADP) y ATP, cofactores esenciales en la agregación plaquetaria; calcio, un elemento sustancial para la formación de fibrina; y la serotonina, un mediador de vasoconstricción y permeabilidad capilar, que en conjunto actúan como amplificadores directos de la respuesta plaquetaria, que podría llevar eventualmente a la formación de trombos, razón por la cual este debe ser finamente regulado para evitar comportamientos fisiopatológicos. (12)

Tabla 1. Contenido de los gránulos α plaquetarios

Gránulos α	
Proteínas integrales de la membrana	GP IIbIIIa, integrina α IIb β 3, GP Ib-IX-V, GP IV, GP VI, P-selectina, lectina (CD62P), PECAM-1 / CD31
Coagulantes, anticoagulantes y proteínas fibrinolíticas	FV, IX, XIII, antitrombina, proteína S, plasminógeno, α 2-macroglobulina
Proteínas de adhesión	Fibrinógeno, VWF, trombospondina, vitronectina, fibronectina.
Quimiocinas	CXCL4 (PF4), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), IL-1 β , NAP-2 (CXCL7)
Citocinas	CD40L TNF α , IL-1 α , CXCL1, CXCL5 (ENA-78), SDF-1 (CXCL12), CXCL14
Factores de crecimiento angiogénicos	EGF, HGF, IGF, TGF- β , bFGF, VEGF,
Factores inhibidores angiogénicos	ANS, endostatina
Proteínas microbicidas	Timosina- β 4, trombocidinas1 y 2
Mediadores inmunitarios	Precursor del complemento C3, precursor del complemento C4, IgG
Factores necróticos	TNF β

Abreviaciones: GP= glicoproteína; CD= antígenos de diferenciación; PECAM-1=molécula 1 de adhesión de células endoteliales plaquetarias; F= factor; VWF= factor von willebrand; CXCL= ligando de quimiocinas (motivo C – X – C); PF4= factor plaquetario 4; ENA-78= péptido 78 activador de neutrófilos derivado del epitelio; IL8= interleucina-8; CCL= ligando de quimiocinas (motivo C – C); MCP-1= Proteína quimioatrayente de monocitos-1; MIP-1 α = proteína inflamatoria de macrófagos 1 α ; IL-1 β = Interleucina-1 β ; EGF= factor de crecimiento epidérmico; HGF= factor de crecimiento de hepatocitos; IGF= factor de crecimiento similar a la insulina; TGF- β = factor de crecimiento transformante β ; bFGF= Factor de crecimiento de fibroblastos básico; VEGF= Factor de crecimiento del endotelio vascular; ANS= angiostatina; IgG= inmunoglobulina G; TNF α = factor de necrosis tumoral alfa; TNF β = factor de necrosis tumoral beta. Tomado y adaptado de: Gremmel T., (2016); Yadav S., (2017). (12, 15)

Tabla 2. Contenido de los gránulos densos plaquetarios

Gránulos densos	
Cationes	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺
Fosfatos	Polifosfatos, pirofosfato
Aminas bioactivas	Serotonina e histamina
Nucleótidos	ADP, ATP, UTP, GTP

Abreviaciones: Ca²⁺= ion calcio; Mg²⁺= ion magnesio; K⁺= potasio; ADP= difosfato de adenosina; ATP= trifosfato de adenosina; GTP= trifosfato de guanosina; UTP= trifosfato de uridina. Tomado y adaptado de: Gremmel T., (2016). (12)

2. FISIOLÓGÍA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

2.1 Endotelio vascular

El endotelio vascular, una monocapa de CE, constituye el revestimiento celular interno de arterias, venas y capilares, por lo tanto, está en contacto directo con los componentes de la sangre. Este además de actuar como una barrera entre la sangre y los tejidos, pueden controlar activamente su grado de relajación, constricción, extravasación de solutos, líquidos, macromoléculas, hormonas, entre otros (16). En condiciones fisiológicas las CE regulan el flujo sanguíneo, ya que presentan una capa de glicocálix, formado por glucoproteínas y proteoglicanos (PG), que reduce su contacto con los componentes sanguíneos celulares y macromoleculares, al presentar una gran carga negativa que repele a las plaquetas (16), provocando que estas puedan circular en un estado discoide inactivo con un flujo sanguíneo laminar muy cerca de la superficie apical, sin formar contactos de adhesión estables a las CE intactas e inactivas (6, 17).

2.2 Actividad antitrombótica de las células endoteliales

Las CE sanas también promueven el estado de inactivación plaquetaria, a través de la síntesis del óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), los cuales presentan actividades antitrombóticas con vías de señalización inhibitorias que reprimen varios puntos clave en la red de la activación plaquetaria, ya que actúan a nivel de los nucleótidos cíclicos intracelulares, que están encargados de regular la actividad de la proteína quinasa G (PKG) y la proteína quinasa A (PKA), y de este modo el estado de reactividad plaquetaria (18). El NO es un factor relajante que mantiene a las plaquetas en reposo, gracias a la regulación positiva que este presenta sobre la guanilato ciclasa soluble (GCs), lo cual conlleva a un aumento de la concentración intracelular de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) y consigo de PKG, que contribuyen en la disminución del calcio intracelular de las plaquetas y consigo la inactivación del receptor de la glicoproteína (GP) IIb/IIIa, el cual es requerido para la unión de la integrina α IIb β 3 al fibrinógeno. Mientras que la PGI₂, generada gracias al actuar de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaciclina sintasa, que convierte el ácido araquidónico (AA) en PGI₂, se une al receptor de prostaglandina I₂ (IP₂) que presenta siete dominios transmembrana acoplados a proteína G regulatoria (GPCR) en la superficie plaquetaria, lo que conduce a una mayor expresión de adenilato ciclasa (AC) y la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) necesaria para la actividad y expresión de PKA por parte de la plaqueta, la cual inhibe la agregación plaquetaria (5) (figura 1). Lo anterior puede verse comprometido por el actuar de la enzima fosfodiesterasa (PDE), una hidrolasa que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster, degradando tanto el AMPc como el GMPc, en el AMP y el GMP respectivamente, favoreciendo la activación de la plaqueta que se encontraba en reposo. Se ha visto que esta presenta tres isoformas: la PDE-3, que actúa fundamentalmente sobre el AMPc; la PDE-2, sobre el GMPc, y la PDE-5, que actúa en ambos (19) (figura 1). Tanto PKA como PKG comparte sustratos que son relevantes en la inactivación plaquetaria, como lo es la proteína relacionada con Ras 1 (Rap-1) que estimula la adhesión de las plaquetas a través de la activación de GP IIb/IIIa, la secreción granular y la generación de tromboxano A₂ (TxA₂) (20); EL factor I de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por Ca⁺² y diacilglicerol (CaDAG-GEFI), encargado de controlar la actividad de Rap-1; y el receptor de inositol trifosfato (IP₃), que regula la

liberación de calcio intracelular (21). Además, en la superficie de las CE podemos encontrar otro mecanismo inhibitorio mediado por la ectonucleasas (CD-39), un componente integral de la superficie de las CE que se activa por medio de sustratos, que puede atenuar la reactividad plaquetaria, hidrolizando al ADP y ATP, potentes activadores plaquetarios que influyen en el tono vascular. De igual manera pueden actuar como ligando para el receptor GPCR, donde genera un intercambio de GTP por GDP en la subunidad α de la proteína G y provocando la disociación de sus subunidades, que le permiten interactuar con distintos efectores, aumentando el AMPc que inactiva a las plaquetas (22).

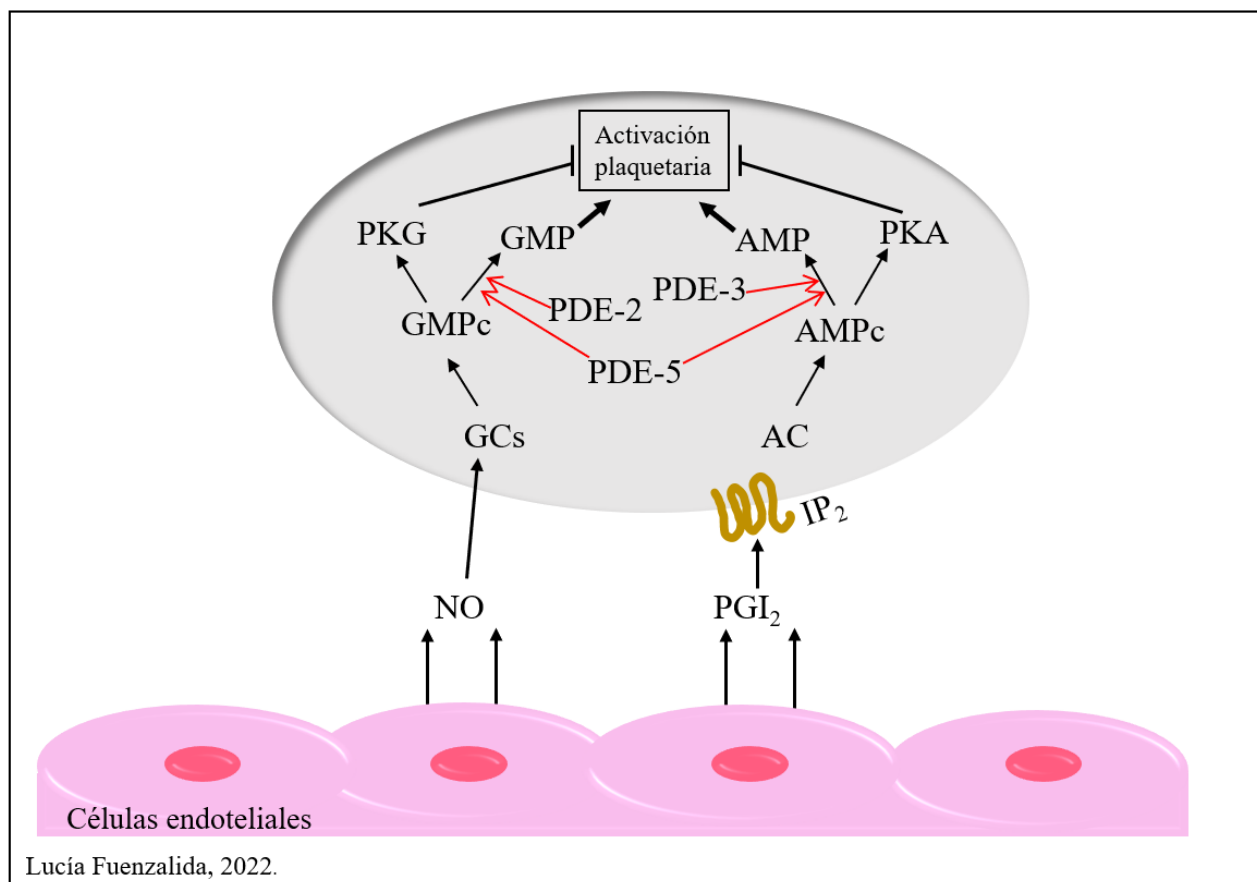


Figura 1. Actividad antitrombótica de las Células endoteliales. Las células endoteliales (CE) sanas secretan óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), los cuales pueden actuar a nivel plaquetario con el fin de mantener a las plaquetas en reposo, a través de la regulación del guanilato ciclasa soluble (GCs) y adenilato ciclasa (AC), que por medio del aumento de GMPc y AMPc, estimulan a la proteína quinasa G (PKG) y a la proteína quinasa A (PKA), respectivamente, que inhiben la activación plaquetaria. Las plaquetas presentan tres isoformas de fosfodiesterasas (PDE), PDE-2, PDE-3 y PDE-5, encargadas de degradar el GMPc, AMPc o ambas, respectivamente.

3. FISIOPATOLOGÍA PLAQUETARIA

3.1 Interacción plaquetaria con endotelio

Se ha observado que frente a señales proinflamatorias las CE, en ausencia de denudación endotelial, se activan y desarrollan propiedades que las hacen adhesivas para las plaquetas. La interacción plaqueta-CE activada estimula la producción de diversas moléculas inflamatorias derivadas de estas, que proporcionan un circuito de retroalimentación positiva con una mayor activación celular, la cual si se mantiene sostenida y exacerbada en el tiempo altera la hemostasia vascular (23-25). Las interacciones desreguladas de plaquetas-CE activadas se han reconocido cada vez más como un mecanismo patogénico importante en el desarrollo de las ECV, puesto que las CE cambian su estado a uno protrombótico aumentando la liberación de ADP y de VWF, e incrementando la expresión de factor tisular (FT), así como de diversas moléculas de adhesión, como ICAM y VCAM (26, 27), que contribuyen al cruce con otras células durante la inflamación vascular, las que luego procede a inducir secreción de diversas quimiocinas, implicadas en el desarrollo y progresión de un medio propicio para la aterosclerosis (6). Por lo tanto, las plaquetas se pueden adherir a la monocapa de CE humana intacta pero activadas, (28) mediante integrinas, una superfamilia de glucoproteínas (GP), formada por heterodímeros glucoproteicos de dos subunidades transmembrana α y β asociadas no covalentemente, que apoyan la adhesión estable de plaquetas e iniciar su activación al transmitir bioinformación bidireccionalmente a través de la membrana plasmática plaquetaria (29). Las plaquetas expresan en su mayoría $\beta 1$ y $\beta 3$, incluidas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha I Ib\beta 3$, de estos, $\alpha I Ib\beta 3$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 2\beta 1$ son los receptores adhesivos más abundantes en la superficie de las plaquetas (30). Se demostró que la integrina $\alpha v\beta 3$, es un receptor de vitronectina en las CE (13), que participa en el reclutamiento de plaquetas hacia el endotelio estimulado; mientras $\alpha 2\beta 1$ (GP VI) es el receptor del colágeno, un componente de la matriz extracelular potente para la activación plaquetaria, que establece una interacción entre el colágeno y el complejo GP VI-RF γ , compuesto por la glicoproteína GP VI asociada al receptor de la región Fc de IgG tipo IIa (RFcgIIa) (20); en tanto $\alpha I Ib\beta 3$ (GP I IbIIIa) es el receptor de varias proteínas adhesivas de la matriz, como el fibrinógeno, vitronectina y VWF. Este último es una gran glicoproteína adhesiva multimérica sintetizada

por las CE y los megacariocitos, almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade y al interior de los gránulos α , respectivamente, siendo secretado en presencia de una activación celular (6), donde actúa capturando a las plaquetas presentes en la circulación al interactuar con la GP Iba, formando un puente de adherencia transitoria, al igual que el fibrinógeno y la fibronectina, en respuesta al elevado cizallamiento del flujo sanguíneo (31). Estas integrinas están presentes en la superficie plaquetaria en una conformación en reposo, presentando una baja afinidad por su ligando, siendo necesaria la activación a través de la presencia de señales que estimulen a las colas citoplasmáticas, las cuales proporciona sitios de unión para adaptadores y proteínas asociadas al citoesqueleto, esenciales en la señalización bidireccional al repercutir en los cambios conformacionales de los grandes dominios extracelulares encargados del aumento de esta afinidad (32, 33).

De modo que la adhesión plaqueta-endotelio en la aterosclerosis ocurre de manera similar a la acontecida cuando se expresan las proteínas de la matriz extracelular en el sitio de la lesión vascular (34), originándose un proceso de varios pasos desde la fijación de las plaquetas, mediada por P-selectina (CD62P), la cual se expresa rápidamente en la superficie endotelial en respuesta a estímulos inflamatorios asociándose a la GP Iba, del complejo proteico plaquetario transmembrana GP Ib-IX-V que se expresa de manera constitutiva en la membrana, y al ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) de plaquetas, permitiendo el rodamiento de estas sobre la monocapa endotelial (35), seguida de una adhesión firme posterior a la pared vascular, debido a que la interacción entre P-selectina/PSGL-1 o P-selectina/GP Iba es rápidamente reversible e insuficiente para una adhesión estable, por lo que se requiere de la integrina α Iib β 3, la cual es capaz de unirse al fibrinógeno unido a ICAM-1 y a la fibronectina que se encuentra unida a α v β 3 en la CE (27). De esta manera las plaquetas se van activando a medida que van rodando a lo largo del endotelio y se adhieren gradualmente con más fuerza hasta generar adhesiones firmes, estáticas y estables (figura 2) (6, 24, 26).

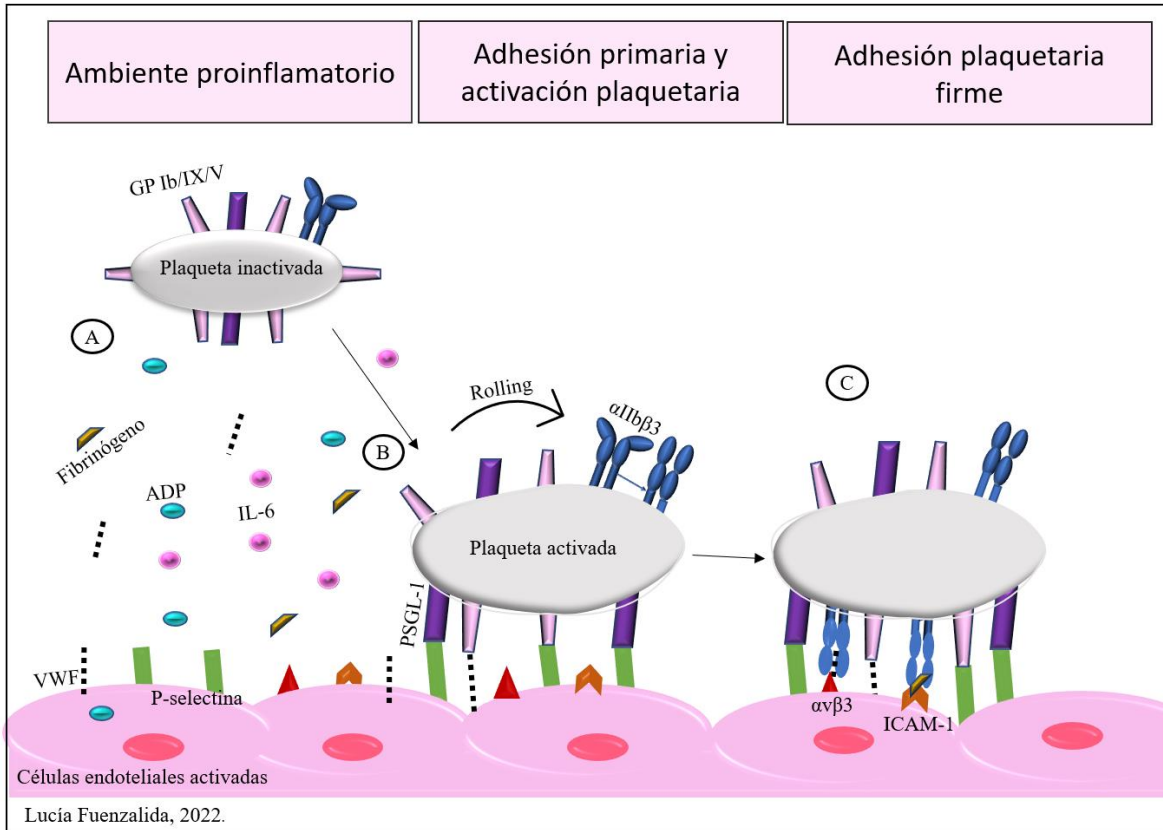


Figura 2. Interacción plaquetaria con endotelio activado. **A.** Frente a un ambiente proinflamatorio las células endoteliales (CE) se activan y expresan P-selectina. **B.** P-selectina puede interactuar con la glicoproteína Iba (GP Iba) y el ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) expresado en la superficie plaquetaria. **C.** Estas interacciones permiten la adhesión primaria y median el rodamiento (rolling) plaquetario sobre el endotelio, lo cual activa a las plaquetas y consigo a su integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, que sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ endotelial, mediante el factor von willebrand (VWF), y con ICAM-1 a través del fibrinógeno, con el objetivo de mediar la adhesión firme.

3.2 Activación plaquetaria

Las interacciones mencionadas anteriormente, permiten el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con un componente inflamatorio en su patogenia, puesto que participan activando aún más las CE, lo que conduce a la expresión y secreción de varias quimiocinas por parte de estas, como también por las plaquetas activadas (23), encargadas de estimular la desgranulación de los gránulos denso y α , junto a la secreción de micropartículas plaquetarias (PMP), provenientes de las protuberancias de membrana que se

desprenden de las plaquetas activadas por vesiculación, que son una fuente abundante de metabolitos proinflamatorios, como ADP, serotonina y TxA₂, sustancias protrombóticas encargadas de amplificar las señales de activación plaquetaria al formar un circuito de retroalimentación positiva (13), por medio de receptores acoplados a proteína G (23). El TxA₂ no se almacena en las plaquetas, este se sintetiza en respuesta a la activación plaquetaria generada por agonistas plaquetarios, y también presentan receptores en CE, eritrocitos y monocitos (6).

Las interacciones que inician el proceso de adhesión de las plaquetas al endotelio activado, son las encargadas de potenciar y dar cabida a otras vías metabólicas involucrada, que favorecen el reclutamiento de células inmunes y su transmigración a través de la íntima, provocadas, en su mayoría, por la secreción de quimiocinas como CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL17, CXCL5 (ENA-78) y CXCL8 (IL-8) (36), que impulsan los cambios en los patrones de expresión de las integrinas plaquetarias (37), permitiéndole interactuar con sus ligandos y formar otras uniones con los receptores ICAM-1, VCAM-1 y vitronectina expresados en las CE activadas (6), que contribuye de forma significativa a los procesos inflamatorios, acompañado de la secreción de IL-1 β por parte de ambas células, que junto con RANTES y CXCL5, median la adhesión y el reclutamiento de monocitos y polimorfonucleares (PMN), encargados de promover la formación de lesiones ateroscleróticas que culminan con la formación de la placa (38), que frente a una reactividad plaquetaria podría conllevar a una erosión, junto con una agregación plaquetaria inmediata, ocasionando coágulos de sangre ricos en plaquetas que bloquean los vasos sanguíneos, produciendo infarto de miocardio o accidente cerebrovascular (14).

3.2.1 Implicación de la GP IIb/IIIa en la activación plaquetaria

La integrina α IIb β 3 (GP IIb/IIIa) es el receptor más abundante en la plaqueta, siendo su señalización bidireccional vital para las funciones plaquetarias, la hemostasia y la trombosis arterial. La unión entre las subunidades GPIIb y GPIIIa ocurre mediante enlaces no covalente, lo que genera el receptor heterodimérico. La mayoría de las GP IIb/IIIa se encuentran en la superficie plaquetaria, y sólo una pequeña parte se almacena en los gránulos α y en el sistema canalicular de la plaqueta. Esta interviene en la adhesión de la plaqueta a la pared vascular y también en la interacción entre plaquetas, conocida como agregación plaquetaria, mediante la interacción de dos GP IIb/IIIa localizadas en plaquetas diferentes que se unirán entre sí a través del fibrinógeno, que hará de nexo (5, 39).

En las plaquetas circulantes, la α IIb β 3 se encuentra en estado de baja afinidad que no es accesible para la unión con sus ligandos (figura 3), por lo que es necesario que haya una interacción de un agonista soluble, como ADP, TxA₂ o trombina, con su respectivo receptor GPCR en la membrana plaquetaria, para que de esta forma se active la plaqueta y se induzca una compleja cascada de señales denominada inside-out, la cual inicia por la activación de PLC que aumenta los niveles de calcio y DAG que inducen a una expresión de la proteína cinasa C (PKC), un evento clave en la liberación de gránulos plaquetarios y la activación de la integrina (40). También se requiere de un aumento del Ca⁺² intracelular, que activa y regula el factor intercambiador de guanina CalDAG-GEFI encargado de activar la pequeña GTPasa Rap1, de esta forma tanto PKC como CalDAG-GEFI, favorecen la activación y translocación de Rap1 GTP a la membrana plasmática plaquetaria (41). Talin-1, una proteína que se une a las colas citoplasmáticas β de las integrinas, interacciona con Rap1 por medio de la molécula efectora formada Rap1-RIAM, permitiendo que Talin-1 se una a la subunidad β , donde provoca la ruptura de los puentes salinos entre las subunidades α y β y la activación de la integrina α IIb β 3 a través de un cambio conformacional en el dominio extracelular, de una conformación “cerrada” de baja afinidad a una conformación “abierta”, desenmascarando el sitio de unión a la integrina, aumentando la afinidad por sus ligando (32), tal como se observa en la figura 3. Cuando α IIb β 3 interactúa con sus ligandos inicia una segunda cascada de

señalización denominada outside-in, dado que la señal proviene desde la superficie de la plaqueta hacia el interior de la célula, generado un cambio en la cola citoplasmática de las subunidades de la integrina, permitiendo el anclaje de complejos de señalización capaces de regular rearrreglos del citoesqueleto que permitirán la formación de agregados plaquetarios estables y la retracción del coágulo (42).

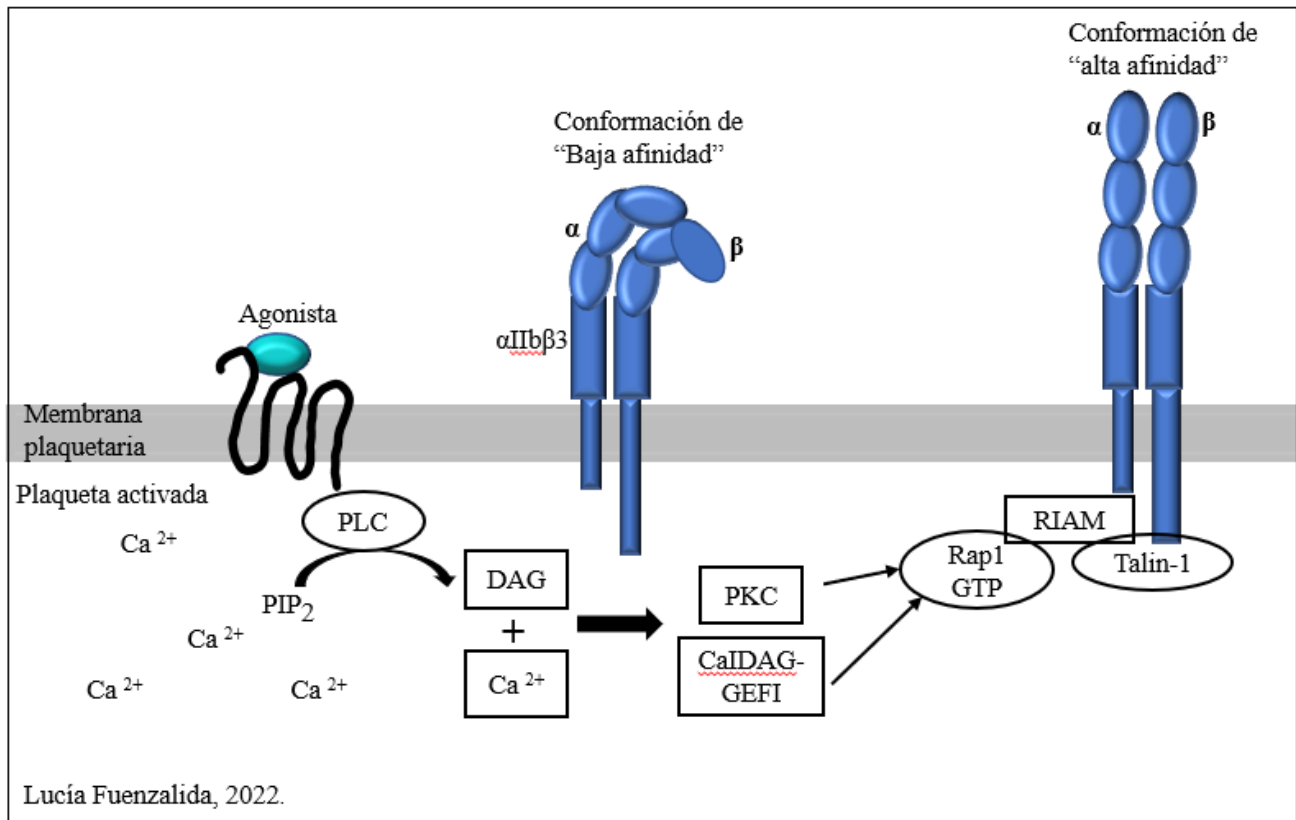


Figura 3. Activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ plaquetaria. Luego de la unión del agonista a su receptor plaquetario, se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC), la cual conlleva a la producción de diacilglicerol (DAG) que activa corriente abajo a la proteína cinasa C (PKC) que es clave para la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, junto al aumento del Ca^{2+} intracelular producido por la activación plaquetaria, El Ca^{2+} activa y regula el factor intercambiador de guanina CalDAG-GEFI. Tanto PKC como CalDAG-GEFI activan y translocan a Rap1 GTP a la membrana plaquetaria donde interacciona con Talin-1 por medio de la molécula efectora Rap1 (RIAM), la cual desenmascara el sitio de unión a la integrina en talin-1, permitiendo que esta proteína pueda unirse a la subunidad β de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, provocándole un cambio conformacional desde un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad por su ligando.

3.2.2 Calcio en la activación plaquetaria

Luego que las plaquetas son activadas, mediante la unión de los ligandos a sus receptores, la concentración de calcio aumenta diez veces ($> 1 \mu\text{M}$) en comparación a su situación en reposo, $0,1 \mu\text{M}$, donde hay una limitación en la entrada de este, a través de la $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaasa}$ ubicada en la membrana plasmática (PMCA), una proteína que tiene la capacidad de transportar calcio en contra de su gradiente electroquímico desde el citoplasma hacia el espacio extracelular o por medio de la $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaasa}$ del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA) que lo envía hacia el retículo endoplasmático (ER) (43). El aumento del calcio intracelular conlleva a la reorganización del citoesqueleto de actina que estimulan el cambio de forma de las plaquetas, permitiendo la centralización de los gránulos y de las organelas plaquetarias, la formación de filopodios transitorios y de lamelipodias que aumentan el área de contacto entre las plaquetas y el endotelio disfuncional (44, 45). Este aumento de concentración de calcio puede provenir de dos fuentes principalmente, una es el calcio que se encuentra compartimentado y la otra proviene del ingreso extracelular de este, ambas son inducidas por agonistas como: el colágeno subendotelial, TxA_2 , GP VI, trombina, y el ATP. Este último interactúa con el canal catiónico P2X1, que le permite la entrada de Ca^{2+} extracelular y el cambio de forma plaquetaria, junto a una secreción secundaria de gránulos. Cabe destacar que la respuesta del receptor P2X1 no se mantiene constante todo el tiempo, debido a que este se desensibiliza de manera rápida y continua (23). De esta forma estos receptores plaquetarios al ser estimulados activan mediadores de diferentes vías de señalización intracelular, como la familia de las fosfolipasas C (PLC), principalmente la isoformas plaquetarias $\text{PLC}\beta_2$ y $\text{PLC}\gamma_2$ (46) (figura 4), la primera está regulada por receptores acoplados a proteína G a través de la subunidad α de G_q , mientras que $\text{PLC}\gamma_2$ está mediado por receptores en su mayoría GP que fosforilan a los motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor de la cadena $\text{FcR}\gamma$, ITAM, que desencadenan una cascada de señalización dependiente de Syk que da como resultado la activación de la $\text{PLC}\gamma_2$ y de fosfoinositido-3 quinasa (PI3K) (47). Ambas vías, tanto la $\text{PLC}\beta_2$ y $\text{PLC}\gamma_2$, hidrolizan fosfoinositido-4,5-bisfosfato (PIP_2) y genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1, 2 - diacil - glicerol (DAG). Donde DAG participa en la entrada de calcio desde el compartimento extracelular e IP_3 induce la liberación de este de las

reservas intracelulares, activando directamente los receptores IP₃-R ubicado en la membrana del ER, que a su vez son canales iónicos permeables al calcio (figura 4). Este receptor presenta tres isoformas, IP₃-R1, IP₃-R2, IP₃-R3, de las cuales solo las primeras dos son predominantes (43). A causa de esta activación se reducen los niveles de reserva del calcio en el ER, que es sentido por la molécula de interacción estromal 1 (STIM 1), una proteína residente, que frente a este estímulo se dimeriza sufriendo un cambio conformacional que promueve la translocación de este a la membrana plasmática plaquetaria donde se asocia con Orai 1, uno de los principales componente del canal de calcio regulado por reservorio (SOC), permitiendo así la entrada de calcio desde el plasma hacia el interior de las plaquetas activadas (46) (figura 4). Este proceso denominado entrada de calcio operada por almacenamiento (SOCE) es la principal vía de entrada de calcio en células no excitable, lo que podría finalmente resultar en un aumento adicional del calcio citosólico sostenidos en el tiempo, que permite el paso de una plaqueta activa a una procoagulante, que se ve potenciado gracias a la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, fosfolípidos presentes en la membrana plasmática interna de manera asimétrica que cumple la función de conservar la estabilidad de la superficie plaquetaria no coagulante, pero frente a un estado activo de estas se expone gradualmente en la membrana externa, otorgándole más carga negativa y consigo una mayor atracción de los factores de coagulación, principalmente los vitamina K dependientes, que junto con la expresión del FT se desencadena la coagulación sanguínea en respuesta a una amplificación de la transducción de señales plaquetarias que genera trombina (6, 48, 49), un agonista potente perteneciente a una serino proteasa alostérica que ejercer sus efectos a través de la escisión proteolítica y la activación de dos receptores GPCR, conocidos como receptores activados por proteasa plaquetaria (PAR), principalmente PAR-1 y PAR-4 presentes en plaquetas humanas (25, 50). La trombina al tomar contacto con sus receptores activa vías de señalización intracelular que incluyen a la: PLC, proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa, proteína quinasa C, proteína quinasas activadas por Rho y COX-2, que en general conducen a una plétora de procesos inflamatorios posteriores, encargados del aumento de: la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, expresión de moléculas de adhesión celular, agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular y la activación de las plaquetas (6).

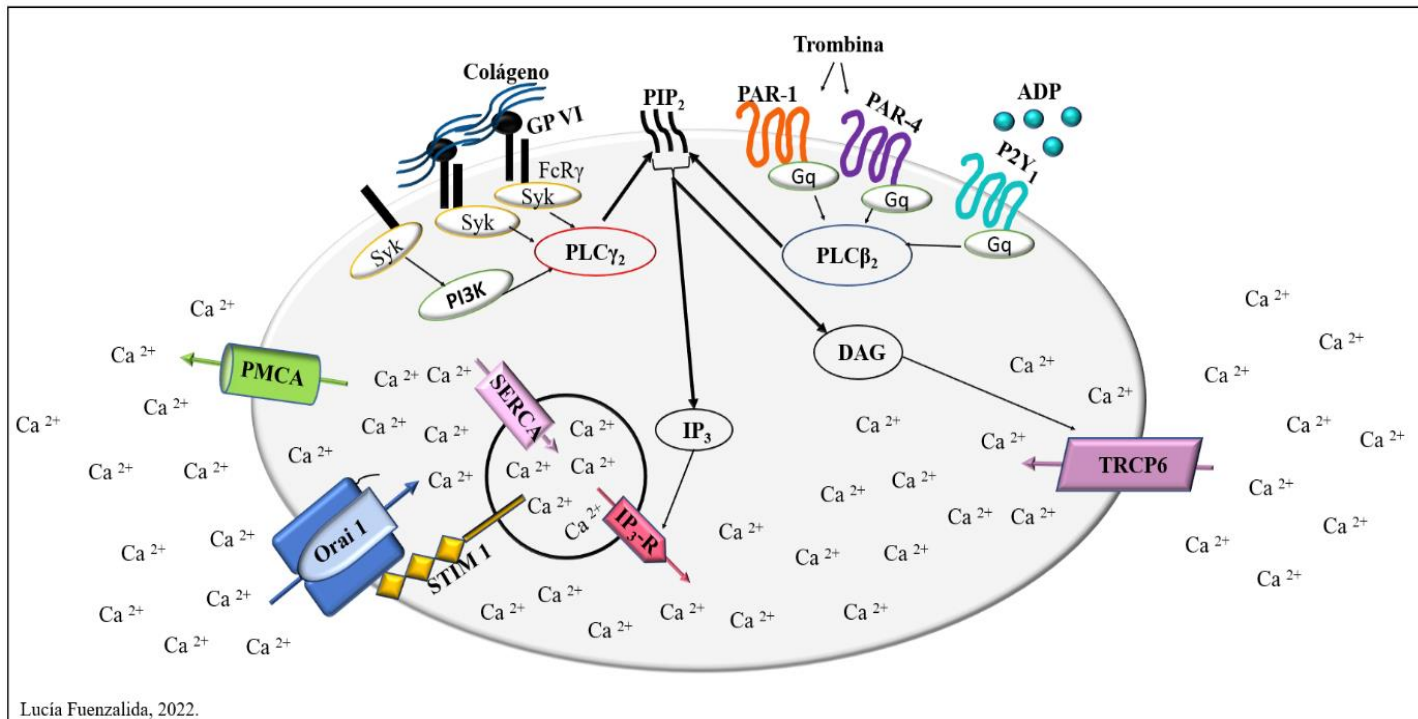


Figura 4. Mecanismo del calcio en la activación plaquetaria. Tras la activación plaquetaria mediada por la estimulación a los receptores plaquetarios, se desencadenan diferentes vías de señalización intracelular que activan a la familia de las fosfolipasas C (PLC), principalmente las isoformas PLC β_2 regulada por la proteína Gq y PLC γ_2 mediada por motivos de activación basados en tirosina (ITAM), ambas vías hidrolizan fosfoinositido-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) y genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y 1,2-diacil-glicerol (DAG). IP $_3$ activa directamente a los receptores IP $_3$ (IP $_3$ -R) liberando el calcio compartimentalizado en el retículo endoplasmático (ER), mientras que DAG ingresa el calcio extracelular mediante TRCP6. Lo anterior disminuye las reservas de calcio intracelular, lo cual es sentido por la molécula de interacción estromal 1 (STIM1), provocando su activación y consigo su asociación con Orai 1 de la membrana plaquetaria, permitiendo el ingreso del calcio al interior de la plaqueta. Lo anterior es regulado por la Ca $^{2+}$ ATPasa ubicada en la membrana plasmática (PMCA), que limita la entrada de calcio, y la Ca $^{2+}$ ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA), que internaliza el calcio en el ER.

3.2.3 Secreción de los gránulos plaquetarios

Luego de la organización de los gránulos plaquetarios tras el aumento intracelular de calcio, ocurre el proceso de secreción del contenido de los gránulos, el cual no solo impulsa la mejora de la señalización de la activación plaquetaria, sino que también activan y reclutan plaquetas circulantes, además son un actor clave en la orquestación de las respuestas

inflamatorias, en particular las que involucran a los monocitos y neutrófilos en proceso de aterosclerosis (51). La exocitosis de gránulos densos es más rápida y sensible a los agonistas, mientras que la exocitosis de lisosomas es lenta y requiere más estimulación, en comparación a la de los gránulos α , la cual se considera intermedia (9). Este mecanismo es un proceso altamente regulado, donde es necesario que las vesículas se fusionen con la membrana plasmática, en el caso de las plaquetas estas siguen la fusión de los gránulos plaquetarios con el sistema canalicular abierto (OCS) y es facilitada por las proteínas SNARE, las cuales se clasifican en dos grupos en base a su ubicación, tenemos las v-SNARE que están localizadas en las vesículas granulares y dos proteínas t-SNARE que están en la membrana de las plaquetas, formando finalmente un complejo SNARE estable que une las dos membranas, la granular y la plaquetaria, sobrepasando las fuerzas electrostáticas repulsivas. Estas también se clasifican en base a la presencia de un residuo de arginina o glutamina en la posición central del dominio, R-SNARE (típicamente v-SNARE) o Q-SNARE (típicamente t-SNARE). Dentro de las v-SNARE están las VAMP-2, -3, -7 y -8, siendo la VAMP-8 la más abundante y funcionalmente importante en las plaquetas humanas, seguido por VAMP-7. Mientras que en las t-SNARE, está conformada por syntaxina y proteínas solubles de unión a NSF (SNAP), de estas la syntaxina 11 y SNAP-23, son esenciales para la exocitosis de los gránulos (4).

Para evitar una liberación indiscriminada del contenido es necesaria la presencia de los reguladores SNARE, una familia de proteínas que regulan estrictamente el sitio de fusión de la vesícula y la membrana diana, conformado por: Munc13-4, isoformas de Munc18, la proteína de unión a syntaxina 5 (STXBP5), Rab27 y proteínas similares a sinatotagmina (SLP). Munc-18b interacciona con syntaxina, actuando como un capuchón que la mantiene en un estado de inactivación que no le permite interactuar con los dominios SNAP-23, mientras que STXBP5 se une a los heterodímeros de syntaxina-SNAP-23, bloqueándolo la función de t-SNARE y disminuyendo el proceso de exocitosis. Pero frente a la activación plaquetaria se promueve el cambio de conformación en las syntaxinas secuestradas por Munc18b y la liberación de STXBP5 del heterodímero, con la finalidad de formar el complejo SNARE, que requiere de Rab27, SLP y Munc13-4, para el acoplamiento

de los gránulos, la fusión de las membranas y la liberación del contenido granular (figura 5). Las proteínas SNAP también participan desensamblando los complejos SNARE, a través de la hidrólisis del ATP, usando la energía disponible para modificar el sitio de acoplamiento, y de esta forma permitir el reciclaje de v-SNARE y t-SNARE en la siguiente ronda de fusión de membranas (9, 52).

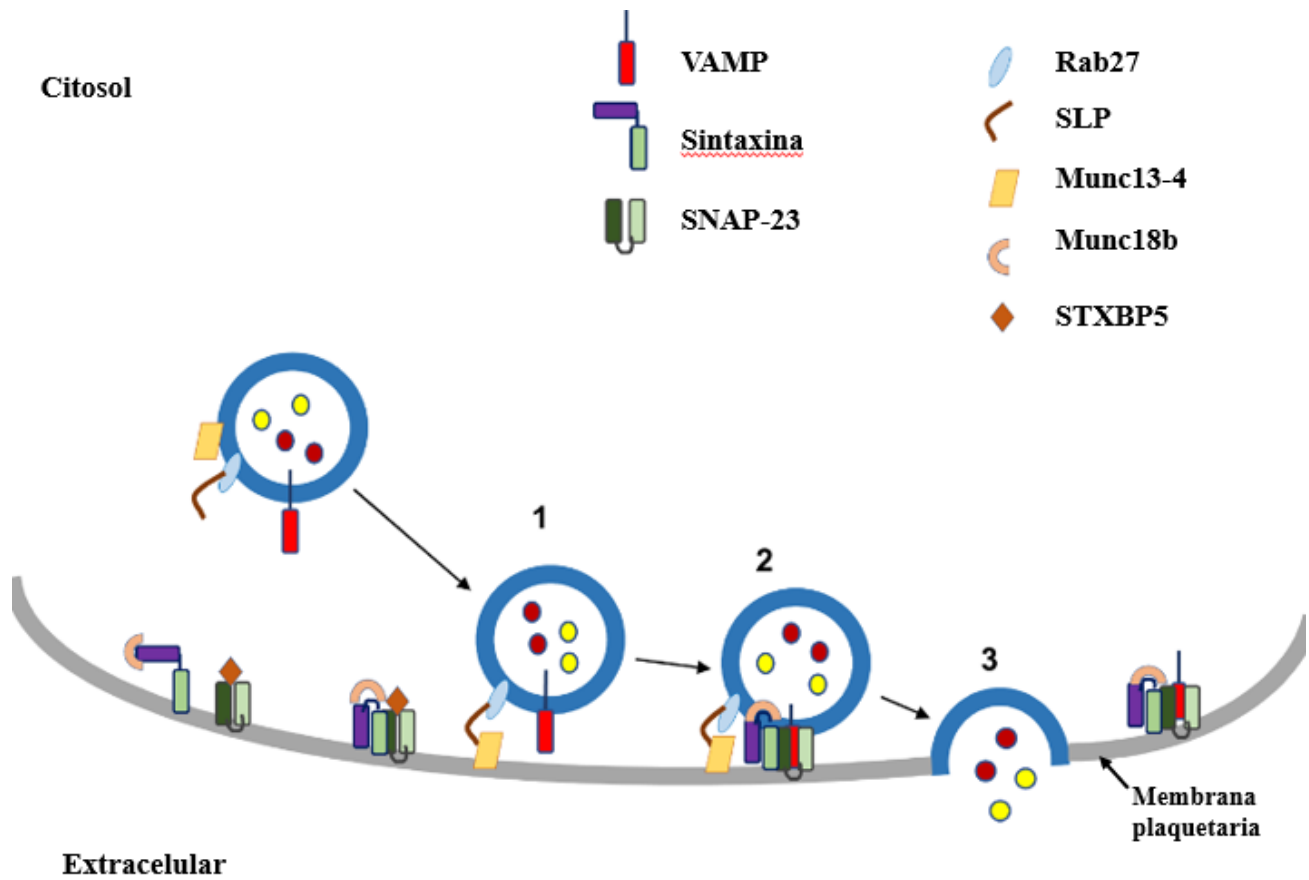


Figura 5. Exocitosis de gránulos plaquetarios mediada por SNARE. Para que ocurra el proceso de exocitosis de los gránulos es necesario **1.** Un acoplamiento de los gránulos, **2.** formación del complejo SNARE y **3.** liberación del contenido granular. En un estado de inactivación plaquetaria Munc18b mantiene en reposo a sintaxina, mientras que la proteína de unión a sintaxina 5 (STXBP5) se une a los heterodímeros de sintaxina-SNAP-23. La activación plaquetaria produce un cambio conformacional en las sintaxinas, permitiendo formar el complejo SNARE compuesto por un v-SNARE (VAMP) y tres t-SNARE (heterodímeros de sintaxina-SNAP-23), que junto a: Rab27, proteínas similares a sinototagmina (SLP) y Munc13-4 forman el poro de fusión de las membranas y la liberación del contenido granular. Tomado y adaptado de (Sharda, A. (2018)) (9).

3.3 Amplificación de la activación plaquetaria

En consecuencia, a los mecanismos anteriores las plaquetas entran en un estado de activación constante, que le permite colaborar directamente en la modulación de la función de las células inmunes al unirse físicamente a ellas o mediante la liberación de moléculas contenidas en sus gránulos en respuesta a la activación durante procesos inflamatorios, los cuales tienen efectos sobre la diferenciación, migración, actividades fagocíticas y microbicidas, formación de trampas extracelulares y eliminación de patógenos (53), tras interactúan con los leucocitos circulantes, las células de la pared de los vasos sanguíneos y las plaquetas activadas por medio de los GPCR, que emiten señales al interactuar físicamente con las proteínas G heterotriméricas que se encuentran en la superficie de la membrana interna (54). Las plaquetas expresan proteína Gq, las cuales están acopladas a receptores agonistas que estimulan la activación plaquetaria, con excepción de la proteína Gs, acoplada a receptores para inhibidores plaquetarios fisiológicos, PGI₂ y adenosina, que median señales inhibitoras estimulando la síntesis de AMPc dependiente de adenilil ciclasa (AC). El ADP es un fuerte agonista plaquetario que interactúa con dos receptores ubicado en la membrana plaquetaria, P2Y₁ y P2Y₁₂ (figura 6), con la finalidad de amplificar y mantener la secreción y agregación inducida por otros agonistas potente. P2Y₁ al interactuar con ADP, genera la primera vía de amplificación crítica en la activación de la plaqueta, mediada por la proteína Gq, la cual activa a la PLCβ₂ que genera IP₃ y DAG, un evento clave en la liberación de gránulos plaquetarios que inducen una fuerte respuesta inflamatoria y la activación de la integrina αIIbβ₃ (6), importante en el proceso de agregación plaquetaria. Por otro lado, P2Y₁₂ acoplado a proteína Gi, actúa inhibiendo la señalización de AC y la formación de AMPc, lo que conduce a una activación alterada de la PKA, pero esta inhibición no es suficiente, por sí misma, para inducir la agregación plaquetaria completa, pero si puede promoverla. También se ha investigado que el recetor P2Y₁₂ induce la activación de las subunidades βγ de Gi, una vía reguladora positiva clave para la activación de la integrina GP IIb/IIIa y la estabilización de los agregados plaquetarios, especialmente inducida por trombina o TxA₂ (6, 11, 55, 56). Finalmente, P2Y₁₂ apoya la generación de trombina al amplificar la exposición de la membrana de fosfatidilserina, la formación de

micropartículas derivadas de plaquetas y la exposición del factor tisular (TF) inducida por colágeno (56), además contribuye a la activación de los leucocitos inducido por la exposición de la P-selectina en la membrana plaquetaria y la formación de agregados de plaquetas-leucocitos (53), junto a una amplificación de la señal de secreción de los gránulos (11).

La activación plaquetaria sostenida induce la liberación de quimiocinas proinflamatorias contenida en sus gránulos, específicamente, RANTES, PF4 y el ligando CD40 (CD40L). Este último se almacena en grandes cantidades al interior de la plaqueta y forma complejos triméricos que se unen a su receptor CD40 de las CE, encargado de inhibir la producción de NO endotelial al desestabilizar el ARNm de la NO sintasa, dando como resultado un fenotipo proaterogénico y proinflamatorio (25), e incluso se ha descrito que pueden unirse a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ de otras plaquetas, lo que permite la formación de agregados. Además, se ha observado que este se fragmenta y se solubiliza formando CD40L soluble (sCD40L), que promueve la activación y la agregación de otras plaquetas, junto a la liberación de MCP-1, IL-8 y la expresión de moléculas de adhesión, tras activar a las CE (24, 27). Tanto MCP-1 e IL-8 actúan como los principales quimioatrayentes para monocitos, favoreciendo su reclutamiento y detención en el endotelio activado por medio de la P-selectina (53) que interactúa con el ligando PSGL-1 en monocito, que se ha visto que está expresado principalmente en la punta de las microvellosidades, permitiéndole aumentar el rodamiento lento y una adhesión más duradera regulada por las plaquetas (37). Bajo estas condiciones de inflamación persistente se favorece la expresión del factor de transcripción NF- κ B, un mediador central de este proceso con múltiples vínculos que intervienen en las interacciones celulares, la supervivencia y diferenciación celular, así como en la expresión de citocinas, quimiocinas, factores de coagulación, moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, y la mejora en la expresión de MCP-1 e IL-8 (figura 6) (57).

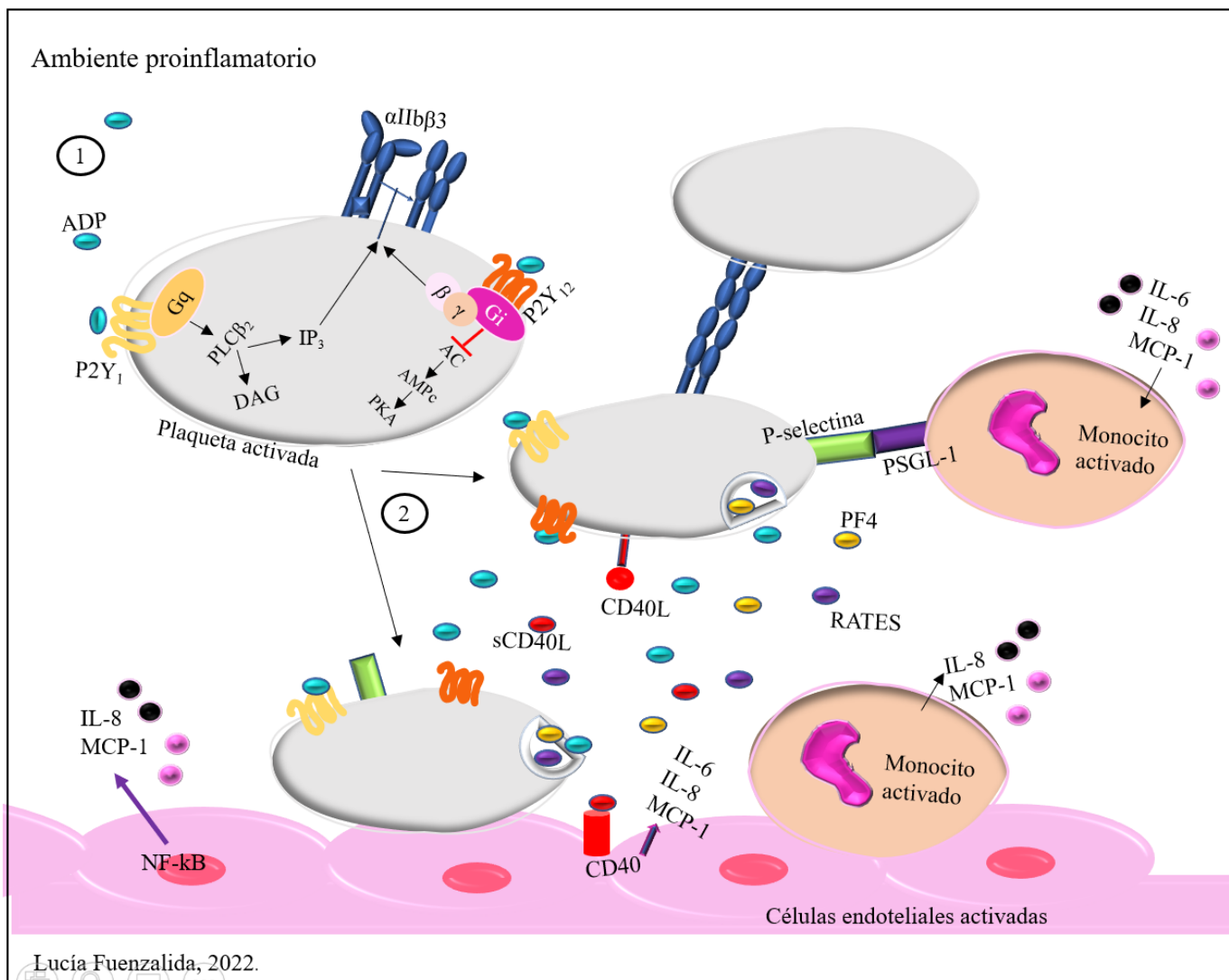


Figura 6. Amplificación de las señales tras la activación plaquetaria. 1. La amplificación plaquetaria sostenida se produce tras la interacción del agonista ADP con sus receptores P2Y₁, acoplado a Gq, que activa la fosfolipasa C beta 2 (PLCβ₂) formando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacil-glicerol (DAG); y P2Y₁₂ acoplado a Gi inhibe al adenilato ciclasa (AC), disminuyendo el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y proteína quinasa A (PKA), mientras que la subunidad βγ de Gi junto a IP₃ estimulan la activación de la integrina αIIbβ₃. 2. αIIbβ₃ activada favorece la agregación plaquetaria y la liberación de moléculas contenidas en sus gránulos como, RANTES, factor plaquetario 4 (PF4) y el ligando CD40 (CD40L), el cual se fragmenta y genera CD40L soluble (sCD40L) que interacciona con su receptor CD40, liberando interleucina 8 (IL-8) y proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP-1), que también son secretadas por las CE tras la expresión del factor de transcripción NF-κB, P-selectina interactúa con el ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) expresado en los monocitos.

3.4 Interacción plaqueta-leucocitos-células endoteliales activadas

Las interacción entre plaqueta-leucocitos-CE activadas se generan en estados protrombótico o proinflamatorio, donde se observa un mayor número de leucocitos en sangre y agregados plaquetarios unidos a las CE activadas, que median el reclutamiento de leucocitos a la pared del vaso activo, que se ve favorecido por la regulación positiva de las moléculas de adhesión endotelial que promueven la unión de los monocitos al endotelio (24). Las plaquetas actúan como reguladoras inmunes que apoyan la quimiotaxis, adhesión y la trans migración de los monocitos hacia sitios inflamados o con lesión, pudiendo inducir en ellos un fenotipo de macrófagos proinflamatorios (58). la formación del complejo plaqueta-monocito es un proceso coordinado de varios pasos que implican la unión y el rodamiento mediado por selectina, seguido de una adhesión estable mediada por integrina. Como se muestra en la figura 7, las interacciones iniciales se atribuyen principalmente a P-selectina, presente en la membrana de las plaquetas en respuesta a las señales de activación, con PSGL-1, expresado constitutivamente en la superficie de la mayoría de los leucocitos, que dan como resultado la activación de integrinas, en particular, la integrina de macrófago (Mac-1) (6), principal integrina $\beta 2$ que facilita la adhesión firme a la superficie de las plaquetas a través de su unión a múltiples ligandos como GP Iba plaquetaria o también con $\alpha \text{IIb}\beta 3$ a través del fibrinógeno (25), que le otorgan una adherencia más firme (24). Estos producen la liberación de citoquinas y quimiocinas como RANTES, MCP-1, IL-8, junto a la expresión de moléculas de adhesión como: ICAM-1 y VCAM-, que se expresan en la membrana de las CE activas e interaccionan con MAC-1 (13), permitiendo la trans migración de leucocitos por el endotelio inflamado que favorecen el desarrollo de aterosclerosis (25).

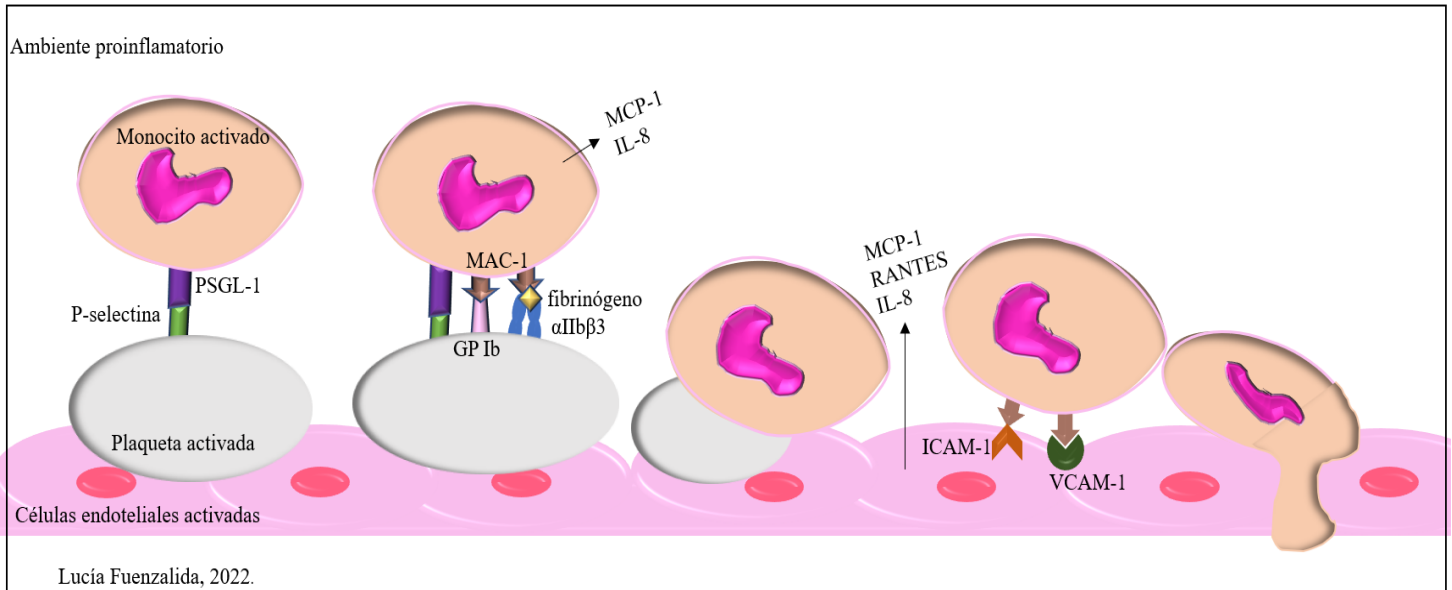
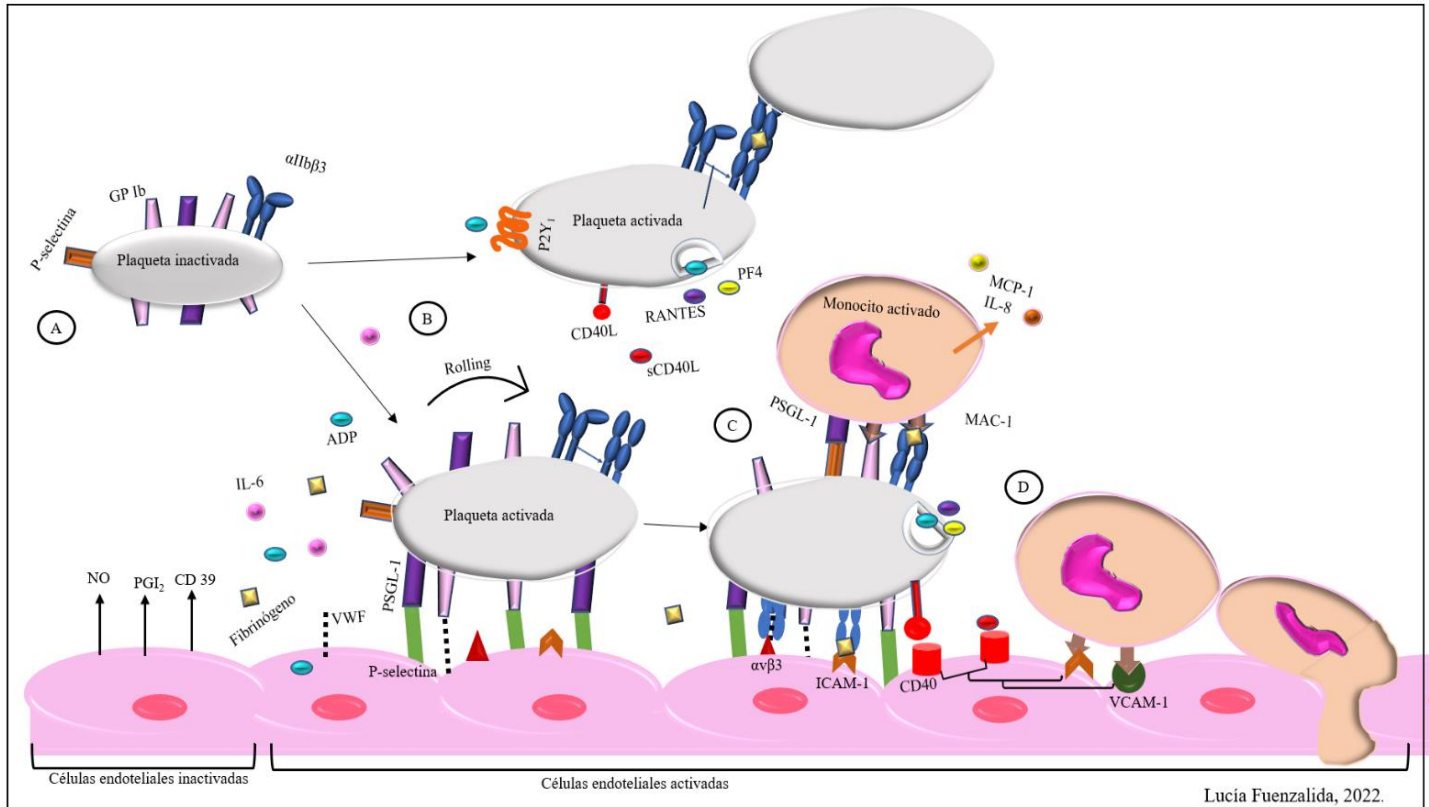


Figura 7. Interacción del complejo y trans migración del monocito. El ambiente proinflamatorio activa a las plaquetas y las células endoteliales (CE), permitiendo que estos formen complejos y recluten leucocitos circulantes. Las interacciones iniciales entre plaquetas-leucocitos mediante P-selectina/PSGL-1, respectivamente, activan a la integrina de macrófago (Mac-1) encargada de generar la adhesión firme al unirse a la GP Ib α y/o $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ por medio del fibrinógeno. La formación de este complejo estimula la liberación de interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotáctica de monocito 1 (MCP-1), RANTES, y la expresión de moléculas de adhesión en las CE como: ICAM-1 y VCAM-1, que interactúan con Mac-1, promoviendo la adhesión y la trans migración de los monocitos a través de las CE activas.

A modo de resumen, la figura 8, ilustra y agrupa las etapas e interacciones más importantes que fueron detalladas anteriormente y resumidas en la tabla 3, donde se destacan los principales agonistas y moléculas de adhesión/receptores plaquetarios, todo en presencia de un ambiente proinflamatorio, que favorece la formación del complejo monocito-plaqueta-CE activadas, con la posterior trans migración del monocito hacia la íntima.



Lucía Fuenzalida, 2022.

Figura 8. Interacción monocito-plaqueta- CE activadas. **A.** El endotelio sano e inactivo otorga un fenotipo antiadherente en las células endoteliales a través de tres vías intrínsecas: la vía ectonucleasas, CD 39 y las vías PGI₂ y NO, que impiden la adhesión y la activación plaquetaria. **B.** En presencia de un ambiente proinflamatorio las Células endoteliales (CE) se activan expresando ligandos de adhesivos como P-selectina y liberando factor Von Willebran (VWF), que interaccionan con las plaquetas por medio del ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) y la glicoproteína (GP) Ib, respectivamente, permitiendo que estas realicen el rolling y se activen. Estas también pueden ser activadas sin adherirse al endotelio por medio de la liberación de difosfato de adenosina (ADP) por parte de las CE activas, que interacciona con el receptor P2Y₁ plaquetario, permitiendo la activación de la integrina α IIb β 3 que interactúa por medio del fibrinógeno con otras plaquetas favoreciendo la agregación plaquetaria. **C.** Se produce una adhesión plaquetaria estable a través de complejos de fibrinógeno entre α IIb β 3/ α v β 3 o ICAM-1 de CE, además el ligando plaquetario CD40 (CD40L) se une a CD40 en las CE, dando como resultado una regulación positiva de las moléculas adhesivas, ICAM-1 y VCAM-1. Las plaquetas adherentes secretan numerosas sustancias bioactivas como ADP, RANTES y PF4, que favorecen el reclutamiento de monocitos activados que presentan PSGL-1 y la integrina de macrófago (MAC-1) que se relacionan con P-selectina y α IIb β 3 o GP Ib, respectivamente, formando el complejo monocito-plaqueta- CE. Estos también liberan interleucina (IL) 8 y proteínas quimiotácticas de monocitos 1 (MCP-1), que actúan como los principales quimioatrayentes para monocitos, favoreciendo su reclutamiento y detención en el endotelio activado. **D.** Los monocitos inician el proceso de trans migración endotelial por medio de la unión de Mac-1 con VCAM-1 e ICAM-1 endotelial.

Tabla 3. Agonistas, ligandos y receptores importantes para la función plaquetaria

Función plaquetaria	Agonistas, Ligandos	Receptores plaquetarios
Adhesión inicial y firme	VWF P-selectina Fibrinógeno Fibronectina P-selectina Vitronectina	GP Ib/IX/V GP Ib/IX/V α IIb β 3 α v β 3 PSGL-1 α v β 3
Activación y amplificación	Trombina ADP ATP TxA2	PAR-1, PAR-4 P2Y1 y P2Y12 P2X1 TP α , TP β
Agregación/ amplificación y estabilización	Fibrina VWF Fibronectina Fibrinogeno-ICAM-1 CD40 SDF-1	α IIb β 3 activado α IIb β 3 activado α IIb β 3 activado α IIb β 3 activado CD40L CXCR4
Interacción con monocito	PSGL-1 MAC-1 Fibrinógeno-MAC-1	P-selectina GP Ib/IX/V α IIb β 3 activado

Abreviaciones: VWF= factor von willebran; GP= glicoproteína; PSGL-1= ligando 1 de glicoproteína de P-selectina; ADP= difosfato de adenosina; ATP= adenosín trifosfato; TxA₂= tromboxano A₂; PAR-1,-2= receptores activados por proteasa plaquetaria 1,-2; TP - α , - β = receptor del tromboxano; CD40L= ligando CD40L; SDF-1= factor 1 derivado de células estromales; CXCR4: receptor de quimiocina CXC tipo 4; MAC-1= integrina de macrófago.

4. LA FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA ATEROSCLEROSIS

4.1 Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica caracterizada por la acumulación inicial de lípidos en la íntima de grandes arterias (59), lo cual induce el reclutamiento de células inmunes y la posterior diferenciación de monocitos a macrófagos, un paso clave en la formación y progresión de la placa aterosclerótica (58), ya que son estos los que luego se transforman en células espumosa debido a la captación gradual de partículas

de LDL nativas y modificadas, en su mayoría como LDL oxidada (ox-LDL), generadas tras un contacto con ROS que permite su oxidación, encargadas de formar las distintivas vetas grasas, que al interactuar con los macrófagos le limitan la capacidad migratoria al interior de la íntima (6). Como resultado, estos se cargan de lípidos, se acumulan y mueren, formando el núcleo necrótico que contiene cristales de colesterol, células apoptóticas y diversos materiales extracelulares, que amplifican las señales que conducen a la secreción de quimiocinas y citocinas, promoviendo un entorno inflamatorio, con más células inmunes y del músculo liso vascular. Paralelamente, las células derivadas de monocitos pueden asumir un fenotipo similar a una célula dendrítica que permite la interacción con las células T, células B, granulocitos y monocitos (36), que conducen a un endotelio disfuncional con un cambio del microambiente vascular que conlleva un aumento de la permeabilidad endotelial y una mayor activación de diferentes células inmunes (60).

La participación de las plaquetas en la aterosclerosis se describió inicialmente en el contexto de la trombosis, provocado por la ruptura de una placa aterosclerótica a causa de una inestabilidad de esta, que se caracteriza por presentar capas fibrosas delgadas (grosor $<65 \mu\text{m}$), escasez de células musculares lisas vasculares, infiltrado de células inflamatorias, y un núcleo lipídico grande(61), que libera una amplia gama de mediadores protrombóticos como la expresión de proteínas de la matriz, entre otros, que actúan como activadores de las plaquetas que circulan inactiva en el medio (62), generando la activación y agregación plaquetaria en la superficie de la placa aterosclerótica rota para evitar el sangrado excesivo, con la posterior formación del trombo, el cual pudiese generar una oclusión vascular trombótica que se asocia a periodos isquémicos (59). Varias investigaciones sugieren que también contribuyen significativamente en los procesos inflamatorios actuando como mediadoras e inmunomoduladoras de la inflamación que contribuye al desarrollo de la aterosclerosis, además estas también juegan un papel importante en el control y mantenimiento de la integridad del endotelio, en parte, a través de la liberación de citoquinas proangiogénicas y factores de crecimiento (6, 63, 64).

Las interacciones plaquetas-endoteliales desreguladas se han reconocido cada vez más como un mecanismo patogénico importante en el desarrollo de la aterosclerosis, debido a que se produce un ciclo de retroalimentación positiva bidireccional con producción de varias moléculas inflamatorias, que incluyen agonistas plaquetarios como la trombina, el TxA_2 , ADP, AA, colágeno y el factor activador de plaquetas (PAF) (25). Este último es un fosfolípido potente sintetizado en los peroxisomas de las plaquetas que le permite el cambio de forma, su agregación, la activación de integrinas y la liberación del contenido de sus gránulos (65), actuando como un mediador de la inflamación implicado en esta afección y en el desarrollo de ECV.

4.2 La influencia de las plaquetas en la estabilidad de la placa aterosclerótica

La función proinflamatoria de las plaquetas juega un rol preponderante en el proceso de la formación de la placa aterosclerótica, ya que regula el inicio y la propagación del proceso aterosclerótico, al modular el microambiente en el núcleo de la placa (25). Existen factores de riesgo independientes de la trombosis arterial periférica, tal como el tabaquismo, la presión arterial elevada, el colesterol total sérico elevado, la diabetes, entre otros, que mejoran la actividad de agregación plaquetaria en las primeras etapas, tras provocar un ambiente proinflamatorio (66) que beneficia el desarrollo de ECV.

La dislipidemia es uno de los factores de riesgo más importantes en la aterosclerosis, asociado con un mal pronóstico, debido al vínculo funcional presente entre la biología de las plaquetas y el metabolismo de los lípidos. Se ha observado que las plaquetas pueden oxidar las partículas de LDL in vitro a través del estrés oxidativo derivado de la NADPH oxidasa (NOX) de CE, que genera más ROS y por ende partículas de ox-LDL unida a plaquetas (27), que amplifican la activación plaquetaria y contribuye a la hiperactividad de estas, tras unirse a sus receptores CD36 o receptor 1 de ox-LDL similar a lectina (LOX-1) (figura 9). Las plaquetas ricas en ox-LDL son rápidamente absorbidas por los monocitos, lo que estimula la transformación en macrófagos que migran a la capa íntima del vaso, donde se convierten en

células espumosas (figura 9), además liberan sustancias, donde destaca el PF4, el cual se ha comprobado que promueve la retención de lipoproteínas, puesto que puede unirse a las ox-LDL y mediar su absorción y esterificación por parte de los monocitos que se transforman en células espumosas, contribuyendo al desarrollo del núcleo lipídico de la placa aterosclerótica y la extravasación de estos, junto a la formación de agregados de plaquetas-monocitos (PMA) (14, 60). Asimismo, ox-LDL aumenta la síntesis de caveolina-1, una proteína integral de membrana, y de dimetil arginina asimétrica (ADMA), la cual compite con la L-arginina por el sitio de unión del óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Ambas actúan como inhibidores del eNOS, encargado de sintetizar en CE el NO, trayendo como resultado un aumento de ROS (sobre todo O₂) y una disminución del NO, lo que favorece la activación y la agregación plaquetaria (27). Por consiguiente, se afirmaría que las plaquetas actúan como mediadores inmunes importantes del fenotipo de los monocitos, particularmente en condiciones de colesterol alto (60). Igualmente, se ha demostrado que las plaquetas humanas expresan la proteína 8 relacionada con el receptor de LDL (LRP8), los cuales al unirse con el receptor de LDL promueven el intercambio de lípidos entre las partículas de LDL y la membrana plasmática plaquetaria, mejoran la unión del fibrinógeno con la integrina α IIB β 3 e inducen un aumento del calcio intracelular, dando como resultado un aumento de la sensibilidad de los agentes activadores de plaquetas, un daño endotelial primario con depósito de lípidos en las lesiones ateroscleróticas y un aumento de la reactividad plaquetaria, siendo esta última más propensas a activarse y agregarse (67). Incluso las plaqueta también expresan largas hebras de membrana cargadas negativamente, llamadas protuberancias inducidas por flujo (FLIPR), las cuales pueden capturar monocitos y neutrófilos circulantes de una manera dependiente de P-selectina/PSGL-1, respectivamente, y luego promover la formación y activación del complejos plaquetas-leucocitos, lo que conduce a la progresión del procesos inflamatorios, el cual si no es resuelto puede verse potenciado por la formación de PMP derivadas de su membrana que tienen un impacto en células adyacentes o distantes (27, 67), ya que liberan citocinas, IL-1 β , RANTES y CXCL4, además de expresar integrinas como α IIB β 3, GPIb, GPIX (CD42a), GPIIb (CD36), y moléculas de adhesión como P-selectina y PECAM-1, JAM-A, que le permite formar agregados de micropartícula-leucocito y reclutar leucocitos hacia las CE activadas, promoviendo la inflamación y la aterosclerosis. Garantizando de esta forma que la vía molecular que involucra a las plaquetas en la formación

de la placa aterosclerótica es variada e implica una extensa señalización a nivel intracelular, que puede estimular la adherencia y controlar la afinidad transitoria experimentada por las células del sistema inmune (68).

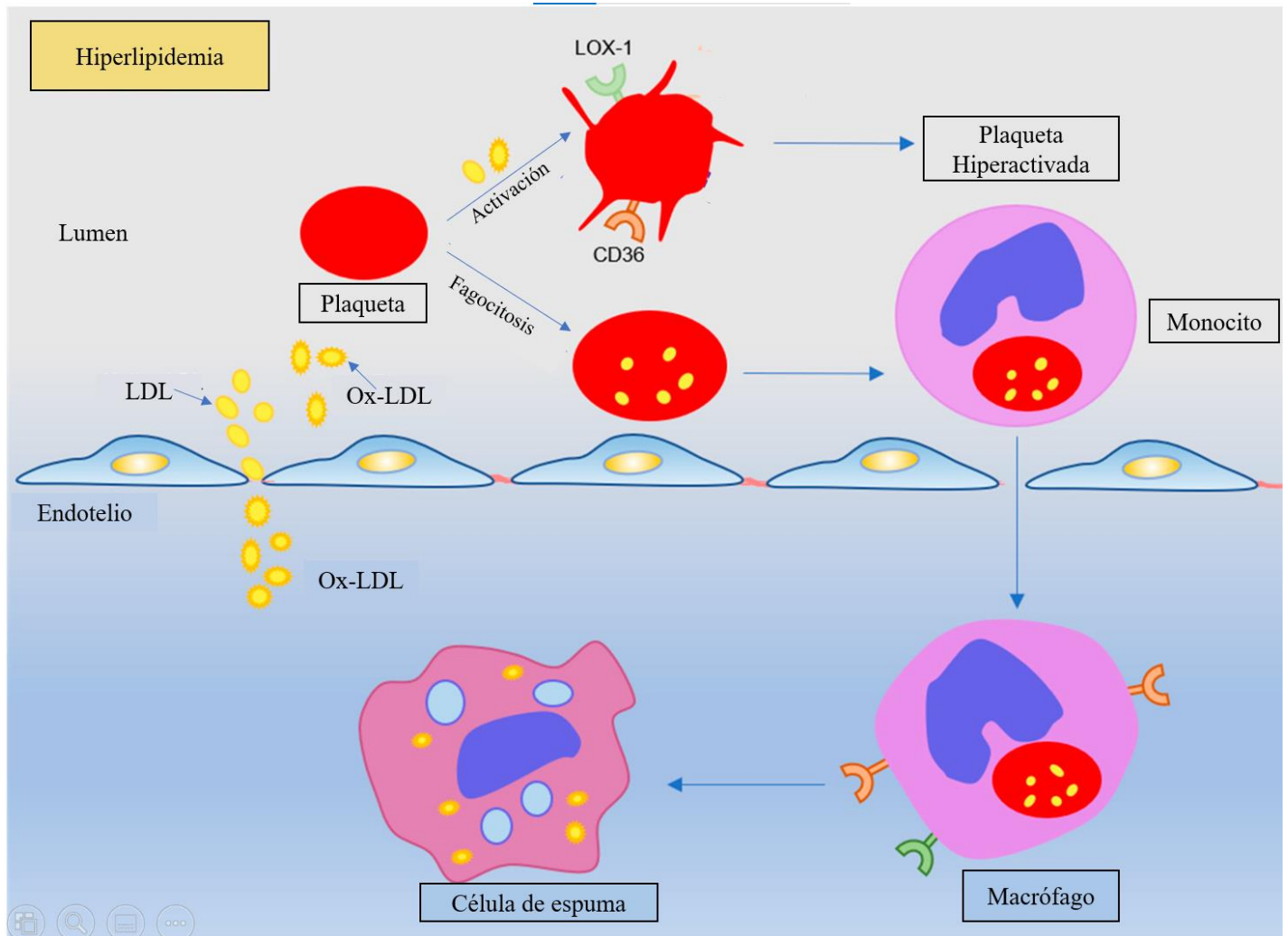


Figura 9. Las plaquetas participan en la aterosclerosis en condiciones de hiperlipidemia. Las lipoproteínas, como las lipoproteínas de baja densidad (ox- LDL) en el plasma, desencadenan la activación plaquetaria al interactuar con CD36 y LOX-1 presente en la membrana plaquetaria. Estas también pueden fagocitar las ox-LDL que luego pueden ser engullidas por los monocitos que migran por debajo de la membrana interna para diferenciarse en macrófagos y células espumosas. Las ox-LDL subendotelial también participa en la formación de placas ateroscleróticas al unirse al receptor CD36 y LOX-1 presente en los macrófagos. Tomado y adaptado de (Wang, L. (2020)) (67)

5. PROCESO DE MIGRACIÓN TRANS-ENDOTELIAL PLAQUETARIO

La capacidad de las plaquetas de transmigrar junto a los monocitos hasta el interior del subendotelio aún no está esclarecido por completo, debido a que esta capacidad se le atribuye a trombocitos nucleados, lo cual no es una característica que presente las plaquetas humanas (4), pero a nivel de biología celular se identificó que las plaquetas tienen la capacidad de locomoción y pueden migrar de forma autónoma en el sitio de la lesión vascular, lo cual lo convierte en un proceso activo iniciado por una cascada de cambios morfológicos que necesitan de las redes ramificadas de actina lamelipodial. En vista a lo anterior Gaertner et al (2017) (4), observó dos hechos importantes, el primero demuestra que la inhibición de la polimerización de actina genera que las plaquetas dejen de migrar, seguido de una pérdida de polarización y una disminución en el área proyectada, causado principalmente por la pérdida de lamelipodios del borde de ataque; mientras que el segundo se basa en la elevación del calcio intracelular, el cual es el encargado de controlar la migración mediante la activación de la miosina IIa que requiere de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (pMLC), que está regulada por la cadena ligera de la miosina dependiente del calcio (MLCK), por lo que en presencia de niveles de calcio elevado, aumenta la actividad de pMLC y consigo la fuerza contráctiles necesarias para la retracción y la liberación de adherencias por parte de las plaquetas (figura 10), que finalmente la conduce a una locomoción autónoma independiente del fibrinógeno, el cual se va acumulado como fibras de fibrina de manera eficiente en las plaquetas, asignándole una competencia como mecanosensora que sondan la resistencia mecánica de su microambiente (4, 69).

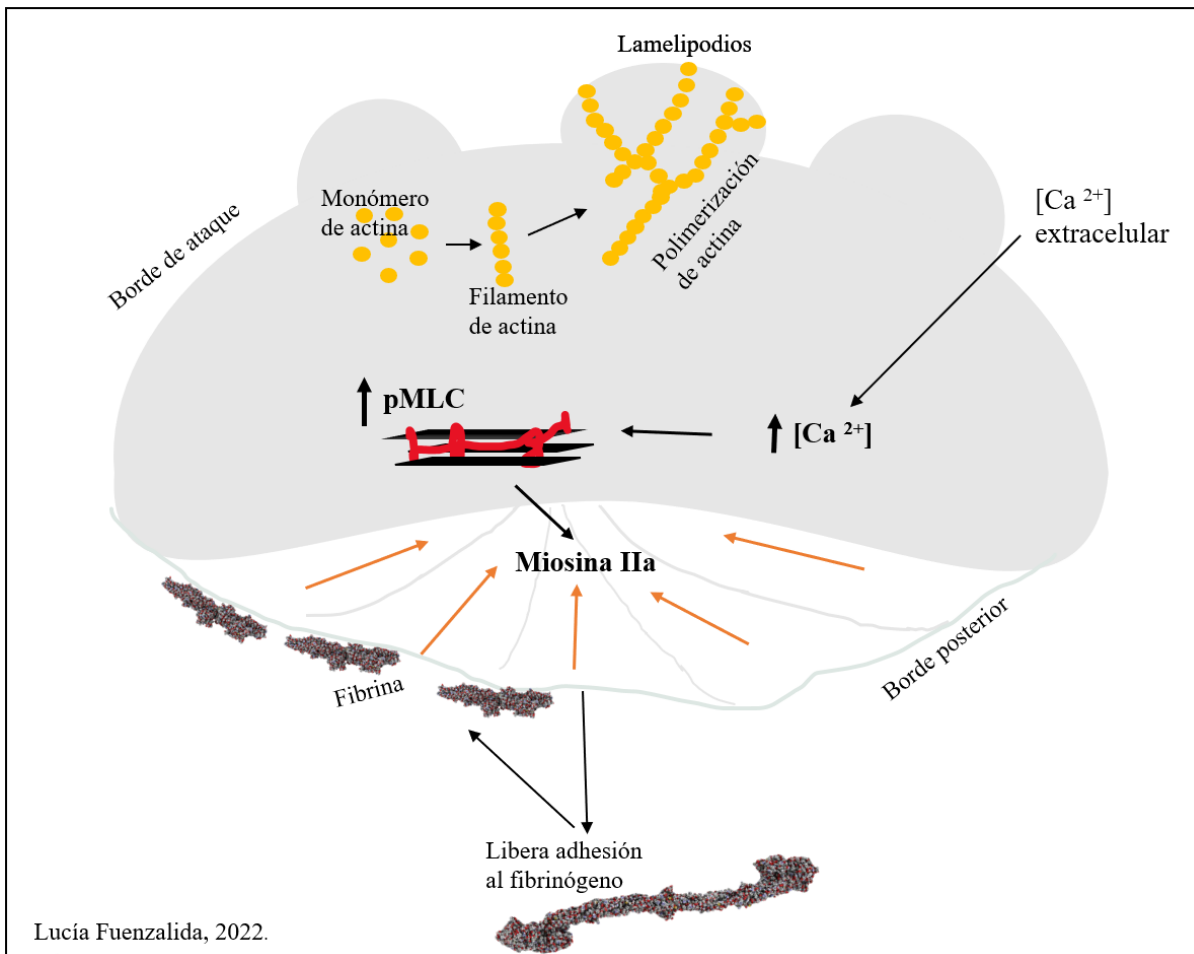


Figura 10. Procesos que permiten la migración plaquetaria. Para que ocurra la migración plaquetaria se requiere la polimerización de actina, la cual está encargada de formar los lamelipodios en el borde de ataque, además es necesario que haya una elevación del calcio intracelular para fosforilar la cadena ligera de la miosina (pMLC), para que consiga se active la miosina IIa, encargada realizar la fuerza contráctiles necesarias para la retracción y la liberación de adherencias a sustratos como el fibrinógeno, acumulando de esta manera la fibrina en su membrana y lograr la locomoción autónoma.

Asimismo se ha visto que la isoforma Rac 1, que son pequeñas proteínas GTPasa de unión específica a GTP, aumentan en presencia de la estimulación plaquetaria por parte de la trombina, junto al contenido de actina F, por encima de los niveles de reposo, lo que origina que desempeñe funciones en la regulación del ensamblaje y la motilidad de la actina, desencadenando la extensión de lamelipodios, necesarios para la migración plaquetaria (69), generados en respuesta a la activación provocada por p21 (PAK), que presenta un dominio regulador de Rac 1, que al activarse, activa a serino/treonina

quinasa que son las efectoras de la cadena abajo de estas GTPasas, que podrían ser clave para el paso de la plaqueta. Lo anterior se sustentaría con el aumento de la expresión del PF4 en las placas ateroscleróticas de ratones hipercolesterolémicos lo que sugiere la presencia de agregados de plaquetas al interior de estas, sin embargo, PF4 también puede ser expresado por un pequeño número de macrófagos, por lo que para confirmar la presencia de las plaquetas al interior de la placa se necesitaría de más evidencia demostrada por medio de una observación directa de los marcadores plaquetarios como CD41, CD42d en diferentes etapas de la formación de la placa aterosclerótica mediante tinción por inmunofluorescencia (58).

La investigación realizada por González et al (2014) (70), nos entrega evidencia que apoya la migración trans-endotelial de las plaquetas, dado que se observó, a través de un modelo de aterosclerosis avanzada, una infiltración subendotelial de monocitos/macrófagos y plaquetas por medio de inmunomarcaje de CD163 y CD61, evidenciando la capacidad que poseen las plaquetas para movilizarse a través del endotelio activado hacia el interior de la pared del vaso, siendo necesaria la existencia de quimiocinas quimioatrayentes y moléculas de adhesión expresadas en las CE activas, donde destaca ICAM, un marcador precoz de aterosclerosis y daño endotelial, los cuales se expresan en respuesta a la IL-1 β y TNF- α secretados en los eventos inflamatorios vasculares. Además, se demostró que las plaquetas en el sitio de la lesión aterosclerótica actúan otorgan estabilidad a la placa y favoreciendo la transformación de los monocitos a células espumosas por medio de un contacto íntimo, dado que estas pueden acumular los lípidos oxidados, ox-LDL, proveniente de un ambiente hipercolesterolémico y aportarlo a los monocitos, contribuyendo al desarrollo del núcleo lipídico a través de la formación de las células espumosas (62, 70).

Se ha estudiado diferentes proteínas como el ligando 12 de quimiocina del motivo CXC (CXCL12) o factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), que se secreta por parte de las plaquetas en presencia de inflamación vascular, y se ha observado que estas dan una señal quimiotáctica al interactuar con la plaquetas a través del receptor de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR4) presente en su membrana plasmática, que provoca una reorganización del citoesqueleto plaquetario estimulando la migración (71, 72). En base a lo anterior Huilcaman

et al (2021) (1) realizó un diseño in vitro con la finalidad de poder comprender las condiciones y mecanismos que podrían permitir que las plaquetas por medio de quimioattractantes lleguen al espacio subendotelial, para lograrlo activo artificialmente a las CE con TNF- α y utilizo como quimioattractante al N-Formyl-metionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), que a diferencia de SDF-1 este no es fisiológico. Donde se observó que las plaquetas solo migraban cuando habían sido co-cultivadas con monocitos, y no en un medio solo con fMLP y TNF- α , sugiriendo que lo monocitos humanos secretan factores encargados de hacer más activas y migratorias a las plaquetas estimulando la migración trans-endotelial plaquetaria, además reducirían la necesidad de interacción física entre estas células, puesto que la mayoría de las plaquetas se encontraban aisladas en la placa de ateroma, no formando uniones estrechas con los monocitos, por lo que este complejo se desvincularía al entrar en contacto con la monocapa endotelial.

Pese a todas las evidencias y a los avances de estos últimos años aún falta revelar cuales son las condiciones, moléculas e interacciones cruciales que permitirían la transmigración plaquetaria, ya que si bien se sabe que estas pueden migrar de manera autónoma y que su hiperactividad es primordial para la formación de la placa aterosclerótica, aún queda la interrogante de como ocurre el proceso del paso de las plaquetas hacia la íntima de los vasos sanguíneos.

6. PLAQUETA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN ATEROSCLEROSIS

El uso de fármacos antiplaquetarios, ya sean administrados como monoterapia o politerapia, son la piedra angular del tratamiento clínico de los episodios trombóticos arteriales y el accidente cerebrovascular isquémico, siendo una prioridad en la lucha contra la mortalidad de las ECV. Los efectos de los antiplaquetarios se basan principalmente en bloquear uno u otro receptor para los agonistas plaquetarios; sin embargo, las vías de señalización que cada receptor activa corriente abajo en algunos casos convergen entre ellas, mientras que en otros no, y esto es lo que ha lleva a utilizar terapias duales para tratar de

abarcar la mayor cantidad de proteínas relacionadas con dichas vías y obtener el efecto esperado. A su vez, es necesario puntualizar que la mayoría de estos medicamentos son permanentes, lo que podría generar algunos efectos adversos para ciertos pacientes, principalmente hemorragias, tras disminuir la actividad funcional plaquetaria (27). En el siguiente apartado se mencionan y se describen los inhibidores y antagonistas plaquetarios más utilizados en la actualidad.

6.1 Inhibidores de la ciclooxigenasa

Las plaquetas tras su activación liberan grandes cantidades de AA de los fosfolípidos de la membrana, el cual se metaboliza rápidamente para convertirse en TxA₂, por medio de las acciones de la enzima ciclooxigenasa (COX) y tromboxano (TX) sintasa. Como ya es sabido la TxA₂ es una potente hormona protrombótica que impulsa la agregación plaquetaria y, por tanto, la formación de trombos sanguíneos. Existen dos isoformas de COX, denominadas COX-1 y COX-2, si bien ambas tienen una afinidad similar por el AA y son homologas en un 90%, presentan diferente afinidad por el sustrato y se encuentran en distintos lugares dentro de la célula. COX-1 se encuentra constitutivamente en muchos tejidos, mientras que la COX-2 es inducible por la exposición a un ambiente proinflamatorio (73).

Con el fin de inhibir COX se implementó el uso del ácido acetilsalicílico (AAS) (nombre comercial "aspirina"), un antiinflamatorio encargado de inhibir irreversiblemente la COX-1 (figura 11), al acetilar los residuos de serina en la posición 529 y 516, respectivamente, lo cual es crucial para una activación plaquetaria reducida y consigo la disminución de la formación de trombos. La aspirina es 170 veces más potente para inhibir la COX-1 que la COX-2, lo que explicaría la "resistencia" a la aspirina por la generación residual de TxA₂ a través de la COX-2 plaquetaria (74). También se ha visto que esta puede reducir la expresión de los receptores de superficie GP IIb/IIIa, P-selectina y la liberación de quimiocinas como CX3CL1 o fractalquina, participantes claves de la adhesión plaquetaria.

(75, 76). Desde el punto de vista terapéutico el efecto antiplaquetario se logra completamente con una dosis baja, dado que dosis más altas son para efectos analgésicos y antiinflamatorios sistémicos. Debido a su accesibilidad, bajo costo y su asociación con la reducción significativa de episodios cardiovasculares, la aspirina se ha convertido en el fármaco más prescrito durante muchos años para la prevención cardiovascular primaria y secundaria (76, 77), pero se ha presentado preocupación en diferentes autores sobre su uso, la dosificación óptima y el intervalo de dosificación, ya que se ha visto que el consumo de aspirina en personas sin enfermedad cardiovascular aumenta los riesgos de hemorragia en poblaciones de alto, bajo riesgo, y en personas con diabetes (78), que se correlaciona tanto con su efecto antiplaquetario como con su inhibición de la producción gastrointestinal de prostaglandinas protectoras. Por tanto, el riesgo hemorrágico de la aspirina aumenta a medida que aumenta la dosis, independientemente de su impacto en las plaquetas (79). Razón por la cual ya no es tan ampliamente recomendable su uso en la prevención primaria, en comparación con los pacientes con enfermedad cardiovascular aterosclerótica establecida.

6.2 Inhibidor del tromboxano

El TxA_2 se une de manera específica al receptor de tromboxano (TP) α y β , unido a la membrana plaquetaria, estimulando la vasoconstricción, agregación plaquetaria y la proliferación celular. Con la finalidad de revertir la unión y reducir la aterotrombosis se han implementado inhibidores específicos como el Terutrobán (80, 81), un antagonista reversible del TP (figura 11), que actúa como un potente agente antitrombótico con propiedades antivasoconstrictoras que mejoran el flujo sanguíneo, al aumentar selectivamente la vasodilatación dependiente del endotelio, e inactivando la plaqueta al inhibir el receptor que estimula la liberación del calcio desde el ER al citoplasma, necesario para inducir la activación de vías de señalización implicadas en la agregación plaquetaria. (80-83)

6.3 Antagonista del receptor de la trombina

La trombina además de ser esencial para la cascada de coagulación también lo es en el proceso aterotrombótico, ya que interactúa con dos receptores acoplados a proteínas G, PAR-1 y PAR-4, principalmente, siendo PAR-1 el efector primordial de la cascada de señalización al presentar una mayor afinidad por la trombina, activando potentemente a las plaquetas (84). Por esta razón se han diseñado moléculas no proteicas, reversibles y altamente selectivas, que actúan como potentes antagonistas competitivos del receptor PAR-1, como Vorapaxar y Atopaxar (figura 11), ambos eficaces y administrados por vía oral. (85). El Vorapaxar se absorbe rápidamente, presenta una larga semivida, lo que hace que su acción reversible se convierta en un efecto irreversible (86), mientras que el Atopaxar es algo más tardío, con una semivida más reducida. Ambos presentan una metabolización hepática lenta por el citocromo (CYP) P450 y la eliminación de ambos fármacos es principalmente vía fecal (95%), aunque un 5% se excreta vía renal. En vista de que su uso redujo los eventos cardiovasculares, pero aumentó el riesgo de hemorragia, este solo debe prescribirse después de una cuidadosa evaluación de la relación riesgo-beneficio y puede ser particularmente beneficioso en pacientes con un alto riesgo de eventos aterotrombóticos y una baja tendencia al sangrado. (82, 84, 85, 87)

6.4 Antagonista del receptor del ADP

El ADP luego de ser liberado por los gránulos densos tras la activación plaquetaria, interactúa con 2 receptores expresados en la superficie plaquetaria, P2Y₁ y P2Y₁₂. Cada uno actúa a través de una cascada de señalización distinta y se requiere la activación coordinada de ambos para inducir la agregación plaquetaria completa. La Señalización vía P2Y₁ induce el cambio de forma de las plaquetas, la agregación reversible y la activación inicial de GP IIb/IIIa, mientras que la señalización a través de P2Y₁₂ perpetúa la activación de GP IIb/IIIa manteniendo su estado de alta afinidad, siendo fundamental para la formación estable de agregados plaquetarios (89). Se ha visto que el antagonismo de P2Y₁₂ también puede atenuar

la expresión de CD40L y P-selectina e inhibir la formación de agregados de plaquetas y leucocitos (88). Pero se ha documentado que una inhibición completa del receptor P2Y₁₂ produce un tiempo de sangrado notablemente prolongado con un mayor riesgo de hemorragia grave (79).

Una de las primeras tienopiridinas, encargadas de antagonizar la agregación plaquetaria y suprimir su efecto amplificador sobre la respuesta plaquetaria a otros agonistas inducida por el ADP (88), fue la Ticlopidina, la cual presenta una absorción extensa y rápida, que demostró ser útil para prevenir oclusiones de stents coronarios y accidentes cerebrovasculares, sin embargo, presentaba efectos secundarios graves, destacando la supresión de la médula ósea, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y neutropenia (82). Esto conllevó que su uso se limitara solo para pacientes que no toleraban el AAS y que se desarrollara un análogo alternativo llamado Clopidogrel (Plavix) (54), ambos inhibidores son selectivos no competitivos del receptor P2Y₁₂ (88), pero este análogo requiere ser metabolizado en el hígado por diversos CYP, con el fin de formar metabolitos activos que presentan un efecto irreversible al unirse de forma covalente a los residuos de cisteína sulfhidrilo presentados dentro del receptor P2Y₁₂. Clopidogrel es uno de los agentes antitrombóticos orales más utilizado junto a la administración de AAS, por proporcionar una protección significativa contra episodios trombóticos, pero posee algunas desventajas como la aparición tardía del efecto y una gran variabilidad interindividual en su capacidad antiagregante conocida como la “resistencia” al Clopidogrel, por parte de algunos pacientes con comorbilidades hepática, resistencia a la insulina o por el polimorfismo de la isoenzima CYP450, generando una respuesta variable y deficiente (54, 89).

El desarrollo de Prasugrel (nombre comercial Effient) se ejecutó tras la alta reactividad plaquetaria a Clopidogrel. Este es un agente irreversible nuevo, una tienopiridina de tercera generación, requiere un solo paso metabólico de las isoenzimas hepáticas CYP para convertirse en un agente activo que antagonice de manera irreversible el receptor plaquetario P2Y₁₂, en un grado similar al metabolito activo de Clopidogrel (82, 90), pero se diferencian en que este se absorbe y metaboliza más eficientemente a su metabolito activo,

permitiendo una mayor concentración en plasma, de esta manera produce una inhibición plaquetaria más rápida y pronunciada con dosis inferiores, con una menor variabilidad interindividual de la respuesta plaquetaria, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias (89). Por lo tanto, su uso es ventajoso en situaciones que requieren una rápida inhibición plaquetaria, pero presenta riesgo de hemorragia, restringiendo su consumo solo a pacientes menores de 75 años y que superen los 60 kg de peso corporal (82, 90).

A diferencia de los demás Ticagregol y Cangregol actúan de manera reversible y específica sobre el receptor plaquetario P2Y₁₂ y no requieren una metabolización previa, ya que no es un requerimiento la conversión metabólica para su activación. Ticagregol no pertenece a la familia de las tienopiridinas, es el primer inhibidor oral reversible que actúa directamente sobre el receptor P2Y₁₂ (89, 91), su tasa de inhibición es más temprana, rápida, constante, con una inactivación bastante lenta (91, 92) y al igual que Clopidogrel participa en la inhibición de la liberación de vesículas extracelulares de las plaquetas, que están implicadas en procesos inflamatorios y trombóticos (93). Por otro lado Cangregol es un potente antagonista que presenta una estructura química semejante al ATP, pero debe administrarse por vía endovenosa para ser activo (94) y desempeña un papel importante en pacientes en quien los tratamientos enterales sean difíciles de administrar, o que requieran una rápida inhibición plaquetaria reversible (82, 95), además presenta una vida media corta, lo que le permite una recuperación de la función plaquetaria en un menor tiempo (96) , dependiendo de la dosis del fármaco (97) . Un desafío importante para estos inhibidores es la aparición de una alta reactividad plaquetaria durante el tratamiento, la cual exponen una respuesta plaquetaria superior a la esperada al agonista (98).

6.5 Antagonista de la GP IIb/IIIa

Debido a lo complicado de la fisiología plaquetaria han surgido diversos intentos por mejorar su inhibición a través del bloqueo de la integrina α IIb β 3, dado que la activación

plaquetaria provocada por diferentes agonistas convergen en la activación de esta GP IIbIIIa encargada de la agregación plaquetaria (82). La inhibición del receptor es por medio de anticuerpos monoclonales que no permiten la unión del receptor GP IIbIIIa al fibrinógeno (27), donde encontramos dos familias de fármacos antagonistas: los encargados de bloquear de manera permanente el receptor plaquetario (Abciximab) y los que inhiben de manera competitiva y reversible (Tirofiban y Eptifibatida) (figura 11) (82). Estos fármacos se administran vía endovenosa, y se limitan a pacientes que no toleran el Clopidogrel. Una limitación es que requiere más del 90% de ocupación del receptor para lograr la eficacia (79).

Abciximab Es un fragmento, Fab, del anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino que reconoce el epítipo del motivo β_3 , fue el primer inhibidor de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ aprobado para su uso en la clínica. Además, presenta una tasa de inactividad lenta que le permite permanecer unido a las plaquetas hasta 12-24 h después de su administración, pudiéndose disociar y reasociarse con nuevas plaquetas sobre las 48 h después de la interrupción de una infusión de Abciximab antes de que la función plaquetaria comience a volver a la normalidad (99). La unión de Abciximab al receptor plaquetario GP IIbIIIa evita la interacción adhesiva del fibrinógeno, el VWF y otras moléculas de proteínas adhesivas con el receptor GP IIbIIIa, lo que interfiere con la agregación plaquetaria y la trombosis (99). Se ha encontrado que el uso de este medicamento tiene propiedades antiinflamatorias únicas, ya que presenta una reactividad cruzada con $\alpha\text{V}\beta_3$ y $\alpha\text{M}\beta_2$ (Mac-1) que se expresan en células endoteliales, células del músculo liso y leucocitos, respectivamente, otorgándole capacidades que no se limitan solo a receptores plaquetarios, si no que también presentan un potencial para influir en la adhesión de las plaquetas a las CE y a los glóbulos blancos, entre otros, inhibiendo las reacciones inflamatorias que se producen después de un daño endotelial. (100-102)

Tirofiban y Eptifibatida son moléculas pequeñas con un menor grado de afinidad por el receptor y una duración de acción más corta (103). Tirofiban es un derivado sintético de tirosina no peptídico, con una marcada especificidad por el receptor de la GP IIbIIIa y una vida media corta. En cambio, Eptifibatida, es un inhibidor reversible heptapéptido cíclico, que inhibe rápidamente la agregación plaquetaria, logrando su efecto máximo dentro de los

15 min posteriores a la inyección y mantiene su potente inhibición durante la infusión, con una semivida plasmática prolongada y una unión a las plaquetas corta (segundos). Una diferencia clave entre Abciximab y las moléculas pequeñas Eptifibatide y Tirofiban es la velocidad a la que estos agentes se disocian de GP IIb/IIIa, donde la tasa de desconexión de Eptifibatida y Tirofiban es de 10 a 15 segundos, frente a las horas que tarda Abciximab (104). Es importante destacar que la Eptifibatida es actualmente el más utilizado de los inhibidores de α IIb β 3 para pacientes con síndrome coronario agudo (54).

Lo expuesto anteriormente se puede resumir en la figura 11, la cual agrupa todos los antiplaquetarios mencionados y su respectiva inhibición. Destacando la propiedad antiinflamatoria que presenta la aspirina y el Clopidogrel, los cuales han mostraron una reducción significativa de la inflamación vascular al disminuir los niveles séricos de marcadores inflamatorios, la reducción de la actividad de NF κ B y un fenotipo de placa más estable. Sin embargo, se ha observado en diferentes estudios, que los pacientes con síndrome coronario agudo tienen un mayor riesgo de trombosis, infarto de miocardio y muerte. Razón por la cual, se están desarrollando tratamientos antiplaquetarios alternativos con el fin de superar estas limitaciones, y su eficacia radica en el control de la activación plaquetaria manteniendo su función base en la hemostasia, ya que como se ha mencionado, la función plaquetaria va más allá de su interacción con el endotelio activado, pues esta participa en crear un ambiente inflamatorio encargado de contribuir en la pérdida de la homeostasis, considerándose un blanco terapéutico importante para evitar el desarrollo de la aterosclerosis y los eventos asociados a esta. (20, 54, 89)

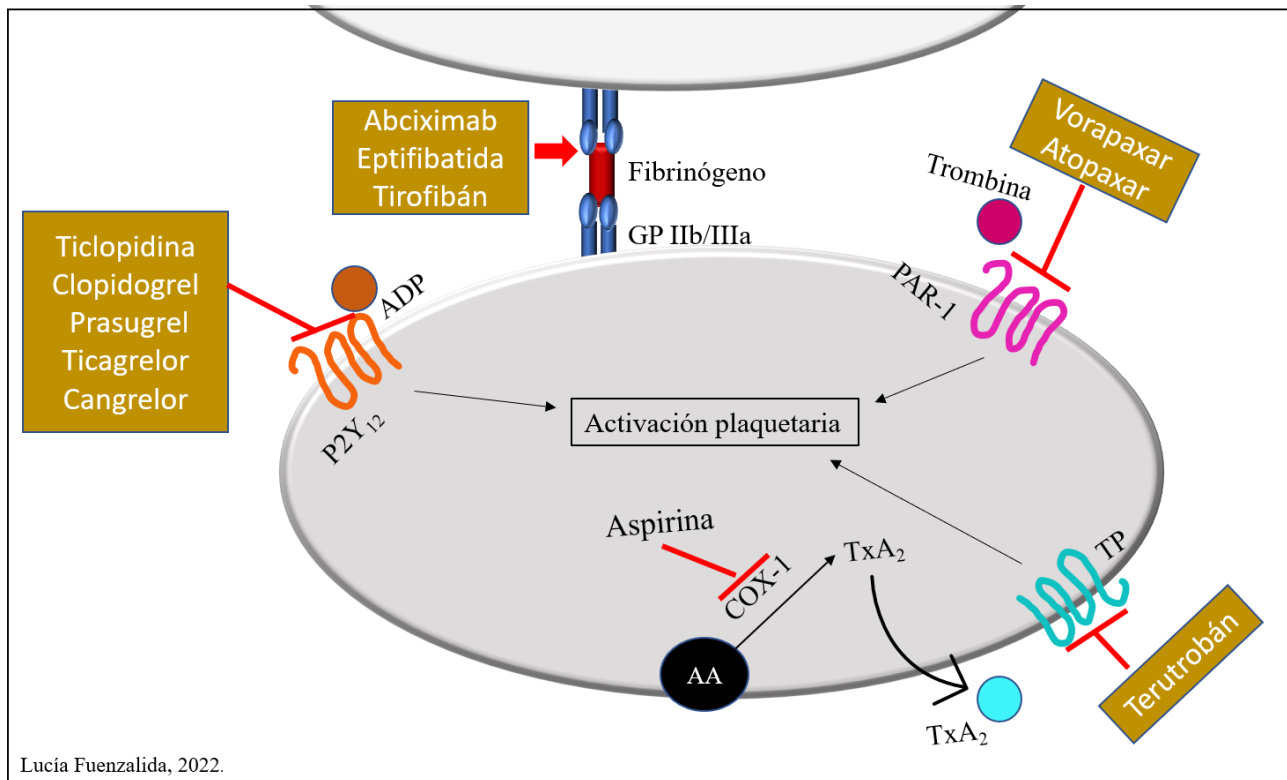


Figura 11. Mecanismo de acción de los fármacos antiplaquetarios. Se muestran los respectivos receptores, agonistas y enzimas que son inhibidos por los antiplaquetarios. AA: ácido araquidónico; ADP: adenosindifosfato; COX: ciclooxigenasa; PAR-1: receptor activado por proteasas 1; TP: receptor del tromboxano; TxA₂: tromboxano A₂.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS: NUEVOS CONCEPTOS FARMACOLÓGICOS

La comprensión más precisa de las complejas vías de señalización de la activación plaquetaria y del vínculo que hay entre la inflamación, la hiperactivación junto a su capacidad inmunitaria innata, se ha convertido en un objetivo importante en la búsqueda de nuevas generaciones de fármacos antiplaquetarios que presenten una inhibición selectiva con una mayor precisión en la trombosis y la hemorragia sin perturbar la hemostasia, contrastando los efectos adversos asociados con los fármacos antiplaquetarios actuales.

En este sentido avances recientes han realizado estudios enfocados en una serie de mecanismos novedosos que regulan positiva o negativamente los eventos de señalización aguas debajo de la activación plaquetaria mediada por receptores, que podrían interrumpir

las vías de manera selectiva dejando intacta la principal función plaquetaria (98). Es importante destacar que esto ha conllevado a la revisión de algunas vías metabólicas plaquetarias establecidos hace mucho tiempo, como es el caso del regulador negativo de la activación plaquetaria, GMPc, el cual recientemente se le ha descubierto su función bifásica en la activación plaquetaria autolimitada, frente a estímulos trombóticos e inflamatorios de bajo nivel, lo que explicaría la ineficacia de los fármacos antiplaquetarios enfocados en la elevación de la concentración de GMPc (105). Igualmente se ha realizado investigaciones en ratones en base a CalDAG-GEFI, una molécula que activa a las pequeñas GTPasas de la familia de proteína relacionada con Ras 1 (Rap1) (106), y que estaría involucrada en la activación plaquetaria completa y la formación estable de trombos (107), al proporcionar una vía de señalización común para la activación plaquetaria aguas abajo de numerosos receptores que estimulan la activación de la fosfolipasa C. Además regula directamente la agregación mediada por integrinas, la liberación de agonistas autocrinos y la generación de tromboxano A₂ (TxA₂), siendo una novedosa estrategia para la terapia antiplaquetaria al proporcionar una protección contra la trombosis en condiciones de cizallamiento similares a las ocurridas en el contexto de la aterotrombosis (108). Sin embargo, es difícil aun poder extrapolar el comportamiento que producirá en humanos, ya que esto se ha visualizado principalmente en modelos de trombosis en ratones, con algunas complicaciones hemorrágicas.

En busca de fármacos que se dirijan específicamente a las plaquetas procoagulantes se observó que la inhibición del canal de agua acuaporina 1 (AQP1) expresados en el OCS de plaquetas humanas y de ratones, provocó la inhibición de la microvesiculación, la exposición a PS, la procoagulación y el tiempo de formación de trombos, con efectos mínimos sobre la secreción de gránulos plaquetarios. Puesto que este canal actúa como un mediador crítico que regula la formación de plaquetas procoagulante y consigo la inhibición de la generación de trombina y la promoción de la hemostasia, sin riesgo de hemorragia, debido a que no altera la función de agregación plaquetaria (109). En este sentido tras realizar un modelo de ratones que carecían de AQP1 se observó que mostraron una respuesta

hemostática normal después de la lesión de los vasos sanguíneos, y las plaquetas de estos animales no mostraron defecto en la agregación o secreción de gránulos densos o α (110).

Se ha demostrado que las estatinas reducen significativamente el riesgo de episodios cardiovasculares importantes, ya que están implicados en la reducción de lípidos y consigo la inflamación, presentando propiedades inmunomoduladoras que inhiben de manera competitiva y reversible, a través de su anillo de lactona y cadenas laterales que las ayudan a unirse al sitio activo de la enzima 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (111), la cual participa en la conversión HMG-CoA en L-mevalonato, un precursor de la síntesis de colesterol, principalmente hepático, reduciendo de esta manera el colesterol sérico, regulando el alza de los receptores hepáticos de lipoproteína de baja densidad (LDL) y aumentando la depuración del colesterol LDL (LDL-C) (112). Esta además tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antitrombótico, puesto que ha presentado una regulación positiva en la actividad de eNOS y los niveles de NO. A su vez, están implicadas en disminuir la expresión del TF, incrementar la generación de trombomodulina e inhibir al factor V, entre otras acciones, que en conjunto a lo anterior actúan inhibiendo la fase de activación y agregación plaquetaria. La atorvastatina, un tipo de estatina, puede inhibir la activación plaquetaria directamente, mediante regulación negativa de la activación de la COX-1 (27). Los hallazgos expuestos por Diamantis et al (2017) (111) apoyan los efectos antiinflamatorios de las estatinas y presentan que el consumo de este medicamento redujo significativa el tamaño de la placa aterosclerótica, convirtiéndolo en un foco de particular importancia. Sin embargo, el efecto de la terapia con estatinas sobre el volumen y la composición de la placa podría diferir esencialmente según las preparaciones de estatinas, las dosis, la duración de la terapia, los métodos de obtención de imágenes y la localización de la placa, limitando su efectividad (113). También en el estudio de Ji et al (2019) (114) se observó que las estatinas reducen el volumen plaquetario medio (MPV), un posible marcador determinante de activación plaquetaria en pacientes con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (27), lo que sugiere indirectamente que las estatinas, como la simvastatina y la pravastatina, podrían inhibir la función plaquetaria a través de múltiples mecanismos que combaten su activación, uno de estos es por medio de una interacción directa o indirecta con

CD36, una GP IV que se expresa en la superficie de una variedad de células, incluidas las plaquetas, y que interactúa con ox-LDL para generar ROS endógeno que promueve la trombosis (114, 115). Asimismo en el estudio de Serebruany et al (116) se demostró que estas pueden inhibir al receptor PAR-1 y no solo el epítipo activado de PAR-1, sino que también reducir el número de receptores intactos en la superficie plaquetaria a las seis semanas de su administración, presentando beneficios inmediatos y a largo plazo. La inhibición de este receptor genera que la trombina, uno de los inductores más potente de la agregación plaquetaria, no pueda estimular la producción de prostaciclina, aumentar el calcio citosólico e inducir la expresión de proteínas de adhesión a la superficie celular (como P-selectina y la molécula de adhesión intercelular 1) (116), requeridos para la activación y adhesión plaquetaria.

Dentro de las investigaciones recientes encontramos las que tienen como objetivo identificar dianas farmacológicas enfocadas en la interacción patológica de la pared del vaso con las plaquetas. Se ha investigado un tipo de Prostaglandina (PG), específicamente la E₂, la cual estimula de forma no selectiva a tres subtipos de receptores de prostaglandinas (EP), EP₂, EP₃ y EP₄, expresados en la membrana plaquetaria. EP₂ y EP₄ están acoplado a G_s aumentando el AMPc intracelular e inhibiendo la activación plaquetaria, mientras que EP₃ está acoplado a G_i, ejerciendo activación plaquetaria (figura 12), por ende, la interacción de PGE₂ a sus receptores provoca respuestas contrabalanceada. El receptor EP₃ se puede bloquear de manera selectiva por medio de un antagonista, como DG-041 (figura 12), un compuesto activo por vía oral con una alta selectividad para EP₃, que permite el predominio de la acción inhibitoria en plaquetas medida por los receptores EP₂ y EP₄ (117). En un estado inflamatorio crónico con formación de placas ateroscleróticas se produce un aumento de la producción de PGE₂ en comparación a las paredes vasculares sanas, a causa de un incremento en la presencia de macrófagos y la activación de su fosfolipasa A₂ que libera AA de las reservas de fosfolípidos de membrana, donde por medio de la COX-2 se produce endoperóxido cíclico prostaglandina H₂ (PGH₂) que finalmente conlleva a PGE₂ (figura 12) (118). Tilly et al (2014) (119) observó que el bloqueo de EP₃ en ratones o voluntarios humanos inhibió la función plaquetaria mientras preservaba la función hemostática, por lo

que dirigirse a la vía de PGE₂/EP₃ como un nuevo objetivo terapéutico podría prevenir la aterosclerosis sin alterar la hemostasia.

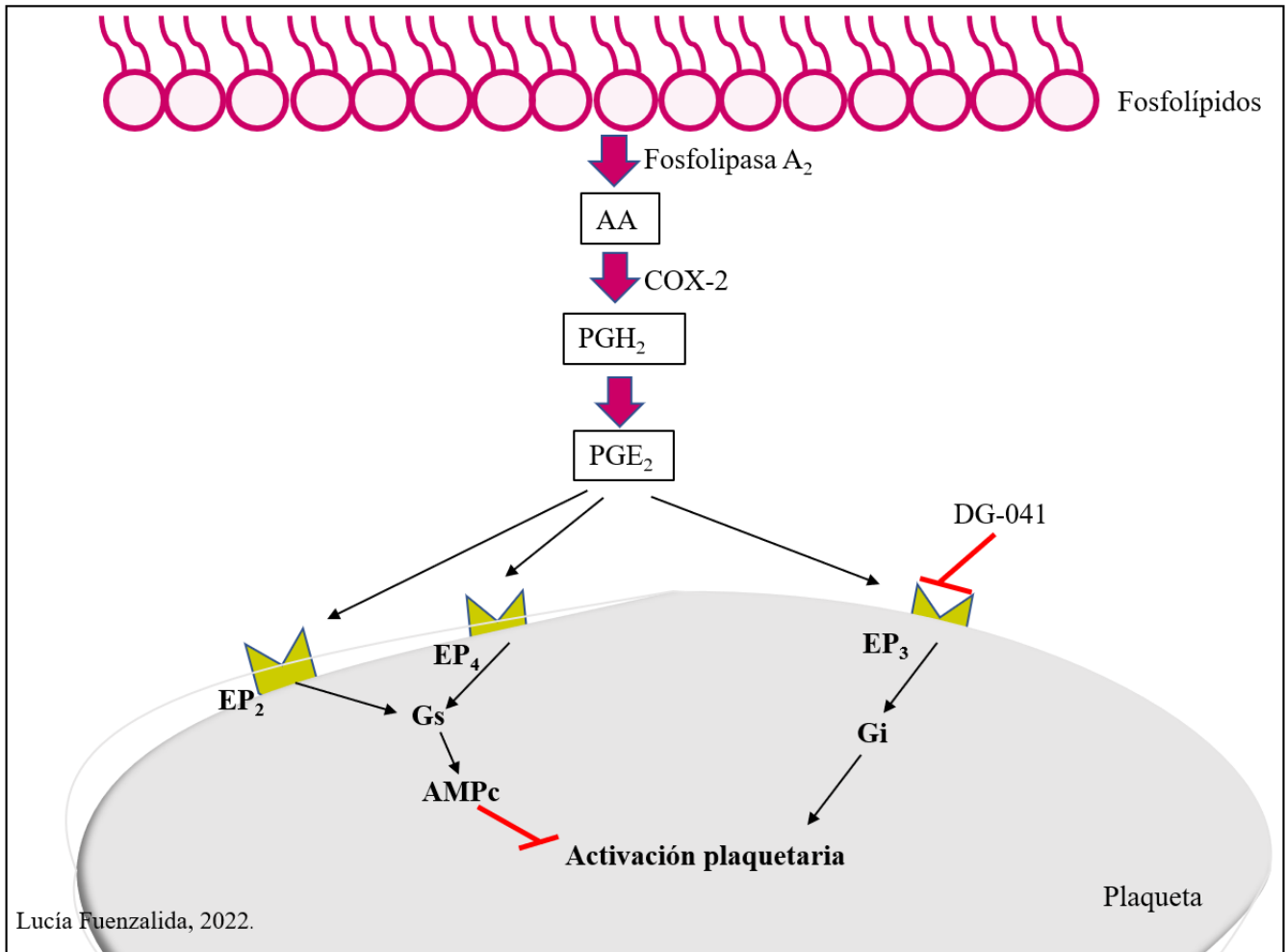


Figura 12. Biosíntesis y receptores de prostaglandina E₂. Se representa el proceso de biosíntesis específicamente de la prostaglandina E₂ y sus respectivos receptores ubicados en la membrana plaquetaria, que activan corriente abajo moléculas que están encargadas de activar o inactivar a la plaqueta. La activación plaquetaria medida por EP₃, puede ser inhibida por DG-041, un antagonista altamente selectivo de EP₃. AA: ácido araquidónico; PGH₂: endoperóxido cíclico prostaglandina H₂, PGE₂: prostaglandina E₂; EP: receptor de prostaglandina; COX-2: inhibidor de la ciclooxigenasa 2; proteína Gs y Gi.

Otra diana terapéutica que estaría involucrada en el desarrollo de la placa aterosclerótica son las moléculas de adhesión CD40 y su ligando CD40L, dado que el sistema CD40-CD40L está asociado con efectos tanto protrombóticos como proinflamatorios (117). Las plaquetas expresan constitutivamente en la membrana plaquetaria el receptor CD40 que tiene un papel importante en la promoción de la activación endotelial y en la atracción de más monocitos y neutrófilos hacia el sitio de la inflamación, mientras que las plaquetas activadas translocan CD40L a su membrana celular, el cual puede escindir-se y liberarse en forma soluble como sCD40L que muestra una actividad similar a la de las citoquinas encargado de contribuir a la fisiopatología de la aterosclerosis y la aterotrombosis (120). Se ha demostrado en ratones que CD40L plaquetario desempeña un papel crucial en el inicio y la progresión de la aterosclerosis al facilitar la formación y adhesión de agregados de plaquetas y leucocitos al endotelio que contribuyen a la patología de la enfermedad y actúan como un marcador temprano de infarto agudo de miocardio, mientras que las plaquetas deficientes en CD40L forman agregados plaquetarios menos estables y previenen la formación de trombos densos (121), por lo que una inhibición tanto del receptor como del ligando es un atractivo objetivo terapéutico (121, 122).

Por lo tanto, las vías expuestas pueden ser de considerable interés como objetivos potenciales para el desarrollo de una nueva generación de agentes antiplaquetarios, basados en el conocimiento adquirido sobre la maquinaria de señalización plaquetaria, que nos permite enfocarnos en mecanismos novedosos que pueden superar algunas de las limitaciones presentes en las terapias ya establecidas.

CONCLUSIONES

En base a la literatura revisada podemos concluir que:

1. En un ambiente proinflamatorio la interacción plaqueta-CE puede ocurrir en ausencia de denudación endotelial, inicialmente por la GP Ib α /P-selectina, y reforzada por las interacciones α Iib β 3/ ICAM-1 y α Iib β 3/ α v β 3, respectivamente.
2. Una liberación desregulada de metabolitos proinflamatorios, como ADP, serotonina y TxA₂ por parte de plaquetas hiperactivadas, amplifican las señales de activación y la liberación de citocinas almacenadas, favoreciendo un ciclo de retroalimentación positiva bidireccional que contribuyen en el desarrollo de la placa aterosclerótica.
3. Frente a procesos inflamatorios las plaquetas actúan como mediadoras e inmunomoduladoras claves en el inicio y la propagación del proceso aterosclerosis al modular el microambiente de la placa.
4. Las plaquetas son capaces de transmigrar a través del endotelio activado de manera autónoma por medio de proyecciones citoplasmáticas en presencia de quimiocinas y moléculas de adhesión endotelial.
5. Los fármacos antiplaquetarios actuales disminuyen la actividad funcional plaquetaria aumentando el riesgo de hemorragia.
6. Una comprensión más precisa de las vías de señalización de activación plaquetaria y de las interacciones patológicas del vaso con las plaquetas, permitirá generar nuevos fármacos antiplaquetarios contra trastornos trombóticos, inflamatorios y hemorrágicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Huilcaman R, Veliz-Olivos N, Venturini W, Olate-Briones A, Treuer AV, Valenzuela C, et al. Endothelial transmigration of platelets depends on soluble factors released by activated endothelial cells and monocytes. *Platelets*. 2021;32(8):1-7.
2. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005;19(2):111-123.
3. Bertomeu Ruiz A, Zambón Rados D. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Medicina Integral*. 2002;40(9):394-405.
4. Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, Fan S, Nicolai L, Busch B, et al. Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*. 2017;171(6):1368-1382.
5. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13:2-7.
6. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents. *Blood Reviews*. 2021;45:1-18.
7. Garcia-Souza LF, Oliveira MF. Mitochondria: Biological roles in platelet physiology and pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;50:156-160.
8. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*. 2009;23(4):177-189.
9. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Research*. 2018;7:1-12
10. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*. 2015;29(3):153-162.
11. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011;25(4):155-167.
12. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(03):191-204.
13. Arman M, Payne H, Ponomaryov T, Brill A. Role of Platelets in Inflammation. In: Kerrigan S, Moran N, editors. *The non-trombotic role of platelets in health and disease*: InTech; 2015. p. 37-62.
14. Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*. 2019;122:1-10.
15. Yadav S, Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*. 2017;28(2):108-118.
16. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):1-22.
17. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1-16.
18. Iberto MF, Asensio M, Sánchez-Luceros A. Fisiología de la función plaquetaria. *Revista sociedad Argentina de hematología*. 2018;22:231-237.

19. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(5):918-930.
20. El Alaoui MZ, Guy A, Khalki L, Limami Y, Benomar A, Zaid N, et al. Antiplaquettaires actuels, en cours de développement et cibles thérapeutiques. *médecine/sciences*. 2020;36(4):348-357.
21. Hamilos M, Petousis S, Parthenakis F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2018;8(5):568-580.
22. Chen J, LÓpez JA. Interactions of Platelets with Subendothelium and Endothelium. *Microcirculation*. 2005;12(3):235-246.
23. Nording H, Baron L, Langer HF. Platelets as therapeutic targets to prevent atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2020;307:97-108.
24. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3378-3384.
25. Kaplan ZS, Jackson SP. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Hematology*. 2011;2011(1):51-61.
26. Santiago JCC, Ruth A. Lezama, Elba Reyes-Maldonado. La activación plaquetaria como factor desencadenante de la inflamación y la aterosclerosis *Cirugía y Cirujanos* 2020:11.
27. Custodio-Chablé SJ, Lezama RA, Reyes-Maldonado E. La activación plaquetaria como factor desencadenante de la inflamación y la aterosclerosis. *Cirugía y Cirujanos*. 2020;88(2):1-11.
28. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(3):329-339.
29. Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S, et al. Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):1-22.
30. Guidetti GF, Canobbio I, Torti M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Advances in Biological Regulation*. 2015;59:36-52.
31. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(s1):200-205.
32. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(s1):206-209.
33. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-461.
34. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in Hemostasis in P-Selectin-Deficient Mice. *Blood*. 1996;87(4):1238-1242.
35. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(8):1413-1422.
36. Domschke G, Gleissner CA. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis. *Cytokine*. 2019;122:1-6.
37. Huo Y, Ley KF. Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2004;14(1):18-22.

38. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(7):887-96.
39. Cosemans JMEM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JWM. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(8):1253-1261.
40. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(3):454-462.
41. Stefanini L, Bergmeier W. CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets*. 2010;21(4):239-243.
42. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell*. 2002;110(5):599-611.
43. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(7):1057-1066.
44. McCarty OJT, Larson MK, Auger JM, Kalia N, Atkinson BT, Pearce AC, et al. Rac1 Is Essential for Platelet Lamellipodia Formation and Aggregate Stability under Flow. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(47):39474-39484.
45. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(210):59-85.
46. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. STIM and Orai in platelet function. *Cell Calcium*. 2011;50(3):270-278.
47. Drelich DA, Bray PF. The Traditional Role of Platelets in Hemostasis. In: Kerrigan S, editor. *The non-trombotic role of platelets in health and disease*: InTech; 2015. p. 23-33.
48. Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet Activation and Blood Coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88(08):186-193.
49. Abbasian N, Millington-Burgess SL, Chabra S, Malcor J-D, Harper MT. Supramaximal calcium signaling triggers procoagulant platelet formation. *Blood advances*. 2020;4(1):154-164.
50. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):250-256.
51. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2017;32(2):162-177.
52. Polgár JN, Reed GL. A Critical Role for N-ethylmaleimide–Sensitive Fusion Protein (NSF) in Platelet Granule Secretion. *Blood*. 1999;94(4):1313-1318.
53. Ribeiro LS, Migliari Branco L, Franklin BS. Regulation of Innate Immune Responses by Platelets. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1-9.
54. Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. *Pharmacological reviews*. 2018;70(3):526-548.
55. Ballerini P, Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1-8.
56. Mansour A, Bachelot-Loza C, Nessler N, Gaussem P, Gouin-Thibault I. P2Y12 Inhibition beyond Thrombosis: Effects on Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(4):2-25.

57. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1-31.
58. Barrett TJ, Schlegel M, Zhou F, Gorenchtein M, Bolstorff J, Moore KJ, et al. Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Science translational medicine*. 2019;11(517):1-14.
59. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, et al. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(7):887-896.
60. Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, von Hundelshausen P, Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 2015;26(5):433-448.
61. Chen Y-C, Huang AL, Kyaw TS, Bobik A, Peter K. Atherosclerotic Plaque Rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016;36(8):1-10.
62. Huilcaman R, Venturini W, Fuenzalida L, Cayo A, Segovia R, Valenzuela C, et al. Platelets, a Key Cell in Inflammation and Atherosclerosis Progression. *Cells*. 2022;11(6):1-11.
63. Layne K, Passacuale G, Ferro A. Chapter 4 - The Role of Platelets in the Pathophysiology of Atherosclerosis and Its Complications. In: Topaz O, editor. *Cardiovascular Thrombus*: Academic Press; 2018. p. 51-65.
64. Ed Rainger G, Chimen M, Harrison MJ, Yates CM, Harrison P, Watson SP, et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*. 2015;26(6):507-520.
65. Tsoupras A, Lordan R, Zabetakis I. Inflammation, not Cholesterol, Is a Cause of Chronic Disease. *Nutrients*. 2018;10(5):1-38.
66. Fuentes E, Pereira J, Mezzano D, Alarcón M, Caballero J, Palomo I. Inhibition of Platelet Activation and Thrombus Formation by Adenosine and Inosine: Studies on Their Relative Contribution and Molecular Modeling. *PLoS ONE*. 2014;9(11):1-9.
67. Wang L, Tang C. Targeting Platelet in Atherosclerosis Plaque Formation: Current Knowledge and Future Perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24):1-24.
68. Pircher J, Engelmann B, Massberg S, Schulz C. Platelet–Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2019;119(08):1274-1282.
69. Li Z, Delaney MK, O'Brien Kelly A, Du X. Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(12):2341-2349.
70. Gonzalez J, Donoso W, Díaz N, Albornoz ME, Huilcaman R, Morales E, et al. High Fat Diet Induces Adhesion of Platelets to Endothelium in Two Models of Dyslipidemia. *Journal of Obesity*. 2014;2014:1-7.
71. Witte A, Rohlfing A-K, Dannenmann B, Dicenta V, Nasri M, Kolb K, et al. The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4. *Cardiovascular Research*. 2021;117(3):903-917.
72. Kraemer BF, Borst O, Gehring E-M, Schoenberger T, Urban B, Ninci E, et al. PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of Molecular Medicine*. 2010;88(12):1277-1288.
73. García Meijide JA, Gómez-Reino Carnota JJ. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*. 2000;27(1):33-35.

74. Sambu N, Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;72(4):683-696.
75. Rauzi F, Kirkby NS, Edin ML, Whiteford J, Zeldin DC, Mitchell JA, et al. Aspirin inhibits the production of proangiogenic 15(S)-HETE by platelet cyclooxygenase-1. *The FASEB Journal*. 2016;30(12):4256-4266.
76. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:1-32.
77. Zheng SL, Roddick AJ. Association of Aspirin Use for Primary Prevention With Cardiovascular Events and Bleeding Events. *JAMA*. 2019;321(3):277-278.
78. Antithrombotic Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9678):1849-1860.
79. Gachet C. Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13:313-322.
80. Lesault P-F, Boyer L, Pelle G, Covali-Noroc A, Rideau D, Akakpo S, et al. Daily administration of the TP receptor antagonist terutroban improved endothelial function in high-cardiovascular-risk patients with atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;71(6):844-851.
81. Fiessinger JN, Bounameaux H, Cairols MA, Clement DL, Coccheri S, Fletcher JP, et al. Thromboxane Antagonism with terutroban in Peripheral Arterial Disease: the TAIPAD study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(11):2369-2376.
82. Badimon L, Vilahur G. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13:8-15.
83. Bousser M-G, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox KM, et al. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events: a randomised, double-blind, parallel-group trial. *The Lancet*. 2011;377(9782):2013-2022.
84. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al. Vorapaxar in the Secondary Prevention of Atherothrombotic Events. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1404-1413.
85. Tscharré M, Michelson AD, Gremmel T. Novel Antiplatelet Agents in Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2020;25(3):191-200.
86. Cheng J. Impact of selective platelet inhibition in reducing cardiovascular risk - role of vorapaxar. *Vascular Health and Risk Management*. 2016;263-268.
87. Pultar J, Wadowski PP, Panzer S, Gremmel T. Oral antiplatelet agents in cardiovascular disease. *Vasa*. 2019;48(4):291-302.
88. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable Platelet Response to Aspirin and Clopidogrel in Atherothrombotic Disease. *Circulation*. 2007;115(16):2196-2207.
89. Wallentin L. P2Y12 inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *European Heart Journal*. 2009;30(16):1964-1977.
90. Michelson AD, Frelinger AL, Braunwald E, Downey WE, Angiolillo DJ, Xenopoulos NP, et al. Pharmacodynamic assessment of platelet inhibition by prasugrel vs. clopidogrel in the TRITON-TIMI 38 trial. *European Heart Journal*. 2009;30(14):1753-1763.

91. Kubisa M, Jeżewski MP, Gasecka A, Siller-Matula J, Postuła M. Ticagrelor – toward more efficient platelet inhibition and beyond. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2018;Volume 14:129-140.
92. Nylander S, Schulz R. Effects of P2Y₁₂ receptor antagonists beyond platelet inhibition - comparison of ticagrelor with thienopyridines. *British Journal of Pharmacology*. 2016;173(7):1163-1178.
93. Gasecka A, Nieuwland R, Van Der Pol E, Hajji N, Ćwiek A, Pluta K, et al. P2Y₁₂ antagonist ticagrelor inhibits the release of procoagulant extracellular vesicles from activated platelets. *Cardiology Journal*. 2020;26(6):782-789.
94. Cada DJ, Baker DE, Ingram KT. Cangrelor. *Hospital Pharmacy*. 2015;50(10):922-929.
95. De Luca L, Steg PG, Bhatt DL, Capodanno D, Angiolillo DJ. Cangrelor: Clinical Data, Contemporary Use, and Future Perspectives. *Journal of the American Heart Association*. 2021;10(13):1-13.
96. Harrington RA, Stone GW, McNulty S, White HD, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Platelet Inhibition with Cangrelor in Patients Undergoing PCI. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(24):2318-2329.
97. Greenbaum AB, Grines CL, Bittl JA, Becker RC, Kereiakes DJ, Gilchrist IC, et al. Initial experience with an intravenous P2Y₁₂ platelet receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention: Results from a 2 part, phase II, multicenter, randomized, placebo and active controlled trial. *American Heart Journal*. 2006;151(3):1-10.
98. Grover SP, Bergmeier W, Mackman N. Platelet Signaling Pathways and New Inhibitors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;38(4):28-35.
99. Usta C, Turgut NT, Bedel A. How abciximab might be clinically useful. *International Journal of Cardiology*. 2016;222:1074-1078.
100. Kereiakes DJ, Runyon JP, Broderick TM, Shimshak TM. Iib's are not Iib's. *American Journal of Cardiology*. 2000;85(8):23-31.
101. Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Powers ER, Grines CL, Cohen DJ, et al. Comparison of Two Platelet Glycoprotein Iib/IIIa Inhibitors, Tirofiban and Abciximab, for the Prevention of Ischemic Events with Percutaneous Coronary Revascularization. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(25):1888-1894.
102. Kim W, Jeong Myung H, Kim Kye H, Sohn Il S, Hong Young J, Park Hyung W, et al. The Clinical Results of a Platelet Glycoprotein Iib/IIIa Receptor Blocker (Abciximab: ReoPro)-Coated Stent in Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(5):933-938.
103. King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein Iib/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban. *Vascular Pharmacology*. 2016;78:10-16.
104. Schneider DJ. Anti-platelet therapy: glycoprotein Iib-IIIa antagonists. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;72(4):672-682.
105. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*. 2017;32(2):162-177.
106. Piatt R, Paul DS, Lee RH, McKenzie SE, Parise LV, Cowley DO, et al. Mice Expressing Low Levels of CalDAG-GEFI Exhibit Markedly Impaired Platelet Activation With Minor Impact on Hemostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016;36(9):1838-1846.
107. Desai A, Bergmeier W, Canault M, Alessi M-C, Paul DS, Nurden P, et al. Phenotype analysis and clinical management in a large family with a novel truncating mutation in

RASGRP2, the CalDAG-GEFI encoding gene. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2017;1(1):128-133.

108. Stolla M, Stefanini L, Roden RC, Chavez M, Hirsch J, Greene T, et al. The kinetics of α IIb β 3 activation determines the size and stability of thrombi in mice: implications for antiplatelet therapy. *Blood*. 2011;117(3):1005-1013.

109. Chu Y, Guo H, Zhang Y, Qiao R. Procoagulant platelets: Generation, characteristics, and therapeutic target. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(5):1-10.

110. Agbani EO, Williams CM, Li Y, Van Den Bosch MTJ, Moore SF, Mauroux A, et al. Aquaporin-1 regulates platelet procoagulant membrane dynamics and in vivo thrombosis. *JCI Insight*. 2018;3(10):1-16.

111. Diamantis E, Kyriakos G, Quiles-Sanchez LV, Farmaki P, Troupis T. The Anti-Inflammatory Effects of Statins on Coronary Artery Disease: An Updated Review of the Literature. *Current Cardiology Reviews*. 2017;13(3):209-216.

112. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circulation Research*. 2017;120(1):229-243.

113. Banach M, Serban C, Sahebkar A, Mikhailidis DP, Ursoniu S, Ray KK, et al. Impact of statin therapy on coronary plaque composition: a systematic review and meta-analysis of virtual histology intravascular ultrasound studies. *BMC Medicine*. 2015;13(1):1-20.

114. Ji S, Zhang B, Wang X, Shi H, Yu L, Wang X. Effects of statin therapy on mean platelet volume in patients with risk of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. *Bioscience Reports*. 2019;39(7):1-9.

115. Magwenzi S, Woodward C, Wraith KS, Aburima A, Raslan Z, Jones H, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. *Blood*. 2015;125(17):2693-2703.

116. Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, Malinin AI, Lowry DR, Tanguay J-F, et al. Effect of Statins on Platelet PAR-1 Thrombin Receptor in Patients With the Metabolic Syndrome (From the PAR-1 Inhibition by Statins [PARIS] Study). *The American Journal of Cardiology*. 2006;97(9):1332-1336.

117. Twarock S, Bagheri S, Bagheri S, Hohlfeld T. Platelet-vessel wall interactions and drug effects. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;167:74-84.

118. Gross S, Tilly P, Hentsch D, Vonesch J-L, Fabre J-E. Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(2):311-20.

119. Tilly P, Charles A-L, Ludwig S, Slimani F, Gross S, Meilhac O, et al. Blocking the EP3 receptor for PGE2 with DG-041 decreases thrombosis without impairing haemostatic competence. *Cardiovascular Research*. 2014;101(3):482-491.

120. Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. The Signaling Role of CD40 Ligand in Platelet Biology and in Platelet Component Transfusion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(12):22342-22364.

121. Xu XR, Zhang D, Oswald BE, Carrim N, Wang X, Hou Y, et al. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2016;53(6):409-430.

122. Kuijpers MJE, Mattheij NJA, Cipolla L, Van Geffen JP, Lawrence T, Donners MMPC, et al. Platelet CD40L Modulates Thrombus Growth Via Phosphatidylinositol 3-Kinase β , and Not Via CD40 and I κ B Kinase α . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35(6):1374-1381.