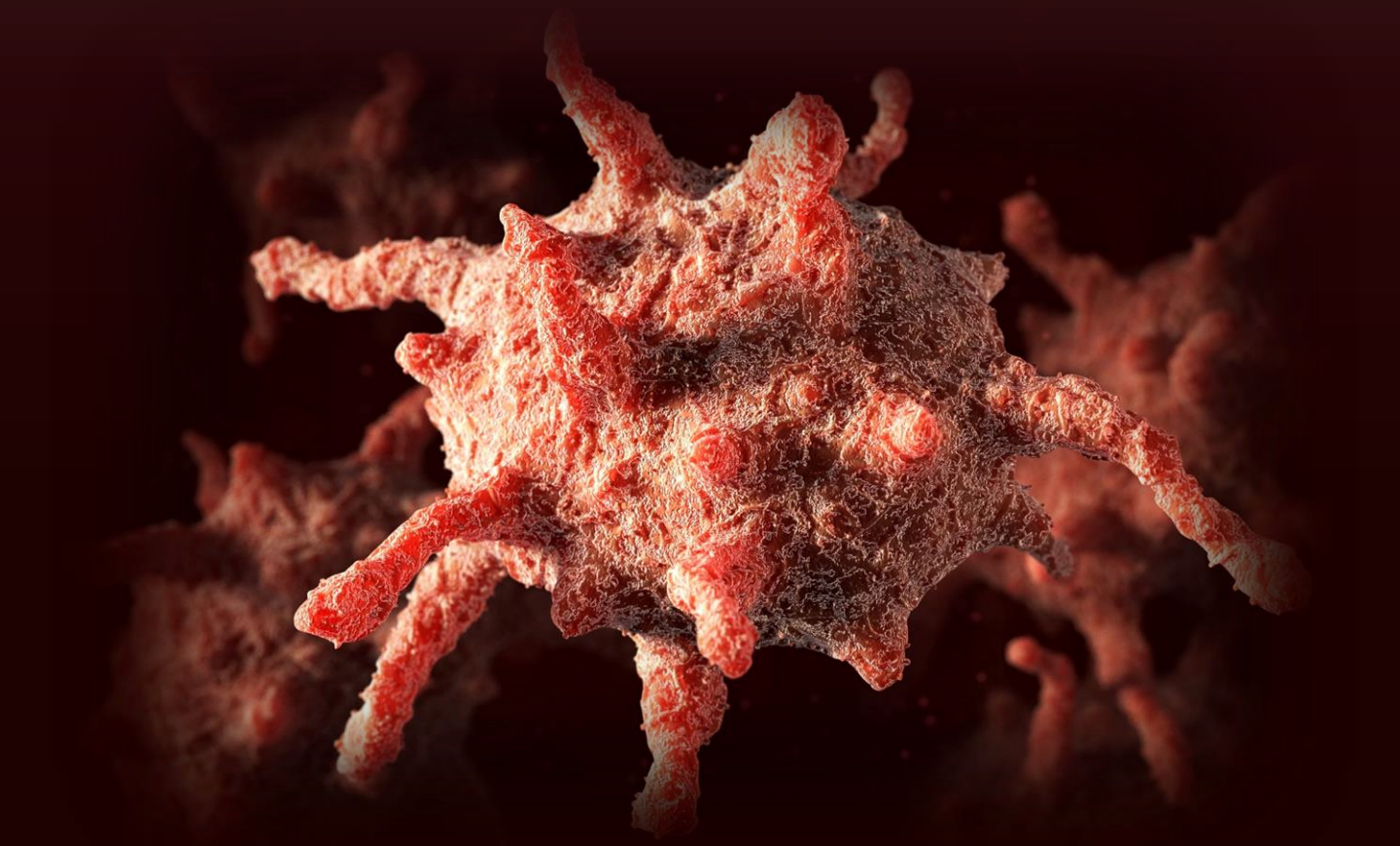
Universidade de Santiago de Compostela
Departamento de Farmacoloxía

Tesis doctoral

Identificación de nuevos biomarcadores y dianas farmacológicas anti-plaquetarias en infarto agudo de miocardio



Paula Vélez Viéitez
Santiago de Compostela, 2016

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA MOLECULAR E ENFERMIDADES CRÓNICAS (CiMUS), DEPARTAMENTO DE FARMACOLOXÍA

E

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (IDIS)







Tesis doctoral

Identificación de nuevos biomarcadores y dianas farmacológicas anti-plaquetarias en infarto agudo de miocardio

Paula Vélez Viéitez

Santiago de Compostela, 2016

Imagen de portada reproducida con licencia de SciencePhotoLibrary.
© 2013 Science Photo Library Ltd. 327-329 Harrow Road, London, UK, W9 3RB
(http://www.sciencephoto.com)

La doctoranda ha sido receptora de una beca predoctoral de la Fundación Ramón Domínguez para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación biosanitaria.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), ref. SAF2013-45014-R.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Dr. Ángel García Alonso

Profesor Contratado Doctor
Departamento de Farmacología
Líder del Grupo “Proteómica de Plaquetas”
IDIS-CIMUS
Universidade de Santiago de Compostela

Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS)
Avda Barcelona s/n
15782 Santiago de Compostela
Tel. 881815429
e-mail: angel.garcia@usc.es

Don Ángel García Alonso, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacología de la Universidade de Santiago de Compostela (USC), y Don José María García Acuña, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la USC

INFORMAN

Que Dña. Paula Vélez Viéitez, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidade de Santiago de Compostela, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES Y DIANAS FARMACOLÓGICAS ANTI-PLAQUETARIAS EN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO**”, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctora por la Universidade de Santiago de Compostela.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos, además de haberse evaluado por otros expertos, lo que dio lugar a su publicación en reconocidas revistas internacionales. Por ello, dan su conformidad a su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento con las disposiciones vigentes, firman el presente en Santiago de Compostela, a 7 de junio de 2016.

Directores:

Dr. Ángel García Alonso Dr. José María García Acuña

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Resultaría complejo nombrar a todas las personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta tesis. No ha sido un camino fácil, pero con la ayuda y apoyo de todas ellas este largo proceso ha ido tomando forma hasta convertirse en lo que hoy aquí presento.

Un agradecimiento especial debo al Prof. Ángel García Alonso y al Dr. José María García Acuña, mis directores de tesis, quienes han apoyado y dirigido mi labor científica de manera incansable e intachable. Gracias a ellos he aprendido que el esfuerzo, el compromiso, la dedicación y como no, la perseverancia, son pilares básicos en una carrera investigadora. No puedo olvidar a todos los colaboradores del Servicio de Cardiología del CHUS, enfermeras y doctores, por el empeño en la toma de muestras esenciales para esta tesis, pero sobre todo por comprender y demostrar que su implicación es esencial para el desarrollo de cualquier investigación en el campo de la biomedicina. Por lo anteriormente dicho, un agradecimiento especial al Dr. González-Juanatey. Agradecer también a la Prof. Mabel Loza y al grupo de investigación BioFarma por su implicación en lo relacionado con la búsqueda de fármacos.

A mis ya más que compañeros de laboratorio (Isaac, Irene y María) por la generosidad que han mostrado en innumerables ocasiones, pero sobre todo por demostrarme una vez más que el trabajo en equipo siempre origina los mejores resultados. En especial a Isaac por su paciencia, por no haber dudado en compartir todo su conocimiento y experiencia conmigo, y por demostrar ser mucho más que un compañero.

A mi familia por el interés con el que cada día se preocuparon por mis avances y por la paciencia que han demostrado en más de una ocasión. De manera especial a mi madre por haberme proporcionado las mejores lecciones de vida y, en definitiva, por ser la promotora de mis sueños. A mi abuela, por ser mi gran inspiración para esforzarme y superarme cada día, aun cuando ya no la tengo cerca. A Alex por haber sabido compartir mi pasión y comprender mis frustraciones, por estar siempre ahí. A todos aquellos amigos que han logrado levantarme el ánimo en momentos de flaqueza.

A todos vosotros, y a muchos más…



"Una vez descartado lo imposible, lo que queda, por improbable que parezca, debe ser la verdad".

Sir Arthur Conan Doyle.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares que circulan por el torrente sanguíneo desempeñando numerosas funciones, la principal de ellas el mantenimiento de la hemostasia primaria, pero además están implicadas numerosos procesos patológicos entre los que destacan los síndromes coronarios agudos (SCAs). El infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) es la forma más severa de SCA, y continúa siendo hoy en día uno de los problemas de salud más relevante de los países desarrollados. Cuando en una placa de ateroma vulnerable se produce una lesión, los componentes protrombóticos de la placa se exponen a la luz del vaso y promueven la activación plaquetaria que lleva a la formación de un trombo en el lugar de la lesión, originando una isquemia que puede ocasionar necrosis. Las plaquetas adheridas al trombo liberan microvesículas (MVs) con actividad proinflamatoria y protrombótica.

Las MVs son fragmentos citoplasmáticos rodeados de membrana liberados a la circulación sanguínea por parte de células activadas, fundamentalmente plaquetas, y representan una forma importante de comunicación intercelular. Se sabe que su número se encuentra elevado en el plasma de pacientes con SCA y que durante un infarto son reclutadas al lugar de la lesión inflamatoria desempeñando un papel importante en la modulación de la aterotrombosis. Por todo ello, uno de los objetivos planteados en esta tesis ha sido el estudio del proteoma de las MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST con el fin de proporcionar información novedosa sobre proteínas que pudieran estar jugando un papel relevante en los eventos fisiopatológicos que subyacen al evento agudo, y que pudieran servir como biomarcadores o dianas terapéuticas para la enfermedad. El análisis proteómico comparativo de MVs del plasma de pacientes con IAMCEST y controles con cardiopatía isquémica crónica estable (CROIAMCEST) se realizó mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE), revelando la existencia de 117 diferencias significativas correspondientes con 25 proteínas únicas. El análisis de biología de sistemas reveló que la mayoría de las proteínas identificadas estaban relacionadas con respuesta inflamatoria, trombosis y enfermedad cardiovascular. Once de estas proteínas se encuentran en redes relacionadas con infarto y 10 en redes relacionadas con aterosclerosis. Además, es importante destacar que varias de las proteínas identificadas están involucradas en la trombogénesis, lo que indica que las MVs pueden estar jugando un papel relevante a nivel local en los eventos aterotrombóticos que conducen a un infarto de miocardio. Los estudios de validación se centraron en dos proteínas con isoformas altamente representadas en el

análisis proteómico y con interés potencial como biomarcadores para el IAMCEST: A2MG y fibrinógeno. Además, se validó la viperina (RSAD2) por su potencial interés.

La falta de núcleo de las plaquetas las convierte en candidatas ideales para estudios proteómicos. Nuestro grupo analizó recientemente el proteoma de las plaquetas procedentes de sangre venosa de pacientes con SCA, con especial énfasis en pacientes con IAMCEST, evidenciando que el proteoma plaquetario se ve alterado durante el evento agudo. Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología del infarto e identificar proteínas alteradas que pudieran servir como posibles biomarcadores o dianas terapéuticas, nos propusimos analizar el proteoma de las plaquetas procedentes de sangre arterial del lugar de la oclusión (en contacto con el trombo) ya que pensamos que podrían reflejar fielmente lo que sucede durante el infarto. Para ello realizamos un estudio proteómico comparativo mediante 2D-DIGE utilizando plaquetas de pacientes IMACEST procedentes de sangre arterial en contacto con el trombo y plaquetas procedentes de sangre arterial periférica de los mismos pacientes. Dicho análisis reveló la existencia de 16 diferencias significativas correspondientes con 15 proteínas únicas, en su mayoría relacionadas con el citoesqueleto y funciones de transducción de señales. Se demostró la sobre-regulación de la integrina αIIb (ITA2B), y de la *Src kinase-associated phosphoprotein 2* (SKAP2) en plaquetas procedentes de sangre de la arteria coronaria ocluida. Estos resultados apuntan hacia vías de activación donde estas proteínas están implicadas como posibles dianas terapéuticas antiplaquetarias en IAMCEST.

Los resultados de los estudios proteómicos realizados por nuestro grupo en plaquetas de pacientes con IAMCEST (incluyendo el realizado en esta tesis) sugieren una participación directa de la vía de del receptor de colágeno específico de plaquetas, la glicoproteína VI (GPVI), en el evento agudo. En los últimos años se ha propuesto firmemente al receptor plaquetario GPVI como un biomarcador útil para la detección temprana de isquemia miocárdica ya que su expresión se ha demostrado aumentada en pacientes con SCA. Todo ello ha dirigido nuestros esfuerzos al estudio en profundidad de este receptor y de su vía de activación, siendo otro de los temas principales de esta tesis doctoral. Inicialmente analizamos el estado de activación de la vía de señalización de GPVI en plaquetas obtenidas a partir de sangre venosa de pacientes con IAMCEST para confirmar su estado de activación, utilizando como grupo control pacientes CROIAMCEST. Como la vía de GPVI funciona a través de fosforilaciones en tirosina (pTyr) de las proteínas que la conforman, el análisis proteómico se basó en inmunoprecipitaciones de las proteínas pTyr tras la estimulación plaquetaria con el agonista especifico de GPVI, *collagen-related peptide* (CRP). Las

inmunoprecipitaciones se resolvieron por electroforesis monodimensional. De entre las proteínas identificadas por proteómica como diferencialmente reguladas se seleccionaron cuatro pertenecientes a la vía de señalización de GPVI para su validación: PLCγ2, SLP76, Dok-2 y G6F. Tras validar los niveles de las formas pTyr de las cuatro proteínas seleccionadas utilizando plaquetas procedentes de sangre venosa en un grupo independiente de pacientes, seguimos la misma estrategia utilizando plaquetas procedentes de sangre arterial en contacto directo con el trombo con el fin de determinar si presentan mayores niveles de activación de la vía que aquellas alejadas del lugar de la oclusión. Los resultados revelaron que la vía de señalización de GPVI se encuentra sobreactivada en pacientes con IAMCEST, y que las plaquetas en contacto directo con el trombo presentan mayores niveles de activación dicha vía que aquellas alejadas del lugar del daño. Además realizamos un estudio piloto de agregación que reveló que la agregación plaquetaria inducida por la activación de GPVI es mayor en pacientes con IAMCEST.

Se ha descrito que GPVI es crítico para la formación de trombosis arterial pero no para la hemostasia normal. Además, diversos estudios han demostrado que su expresión en la superficie plaquetaria se encuentra elevada en pacientes con SCA. Con esto en mente y teniendo en cuenta el papel relevante que juega el receptor GPVI en los SCAs, y más en concreto habiendo demostrado el papel clave que juega la activación de dicho receptor en el IAMCEST, no cabe duda de que su inhibición podría suponer un gran avance en el tratamiento de estas enfermedades. Todo ello, junto con el hecho de que GPVI se expresa solamente en las plaquetas y megacariocitos, ha hecho de este receptor una diana farmacológica antitrombótica prometedora para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Por este motivo una amplia sección de esta tesis aborda el estudio de la inhibición del receptor GPVI. Tras determinar mediante estudios de agregación que GPVI es el principal receptor responsable de la agregación inducida por colágeno, hemos abordado el estudio de la inhibición de dicho receptor. Por un lado hemos tratado de caracterizar el potencial inhibitorio que tiene el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 (cedido por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Japón)) sobre GPVI tanto a nivel de agregación como a nivel bioquímico. Por otro lado hemos estableciendo las bases para la identificación de pequeñas moléculas inhibidoras de GPVI para su uso como potenciales agentes antitrombóticos mediante técnicas de cribado de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índices

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice general

		Página
	Abreviaturas	xv
1	**Introducción**	**1**
1.1	**Plaquetas**	**3**
1.1.1	Definición y biogénesis	4
1.1.2	Subpoblaciones de plaquetas	4
1.1.3	Estructura de las plaquetas	5
1.1.4	Receptores plaquetarios	6
1.1.5	Principales vías de secreción plaquetaria	7
1.1.5.1	Vía clásica de secreción de proteínas	7
1.1.5.2	Vías alternativas de secreción de proteínas. Microvesículas e importancia de su estudio	8
1.1.6	Función plaquetaria	9
1.1.6.1	Funciones fisiológicas de las plaquetas	9
1.1.6.2	Funciones patológicas de las plaquetas	11
1.2	**El receptor de colágeno GPVI: función y relevancia como diana farmacológica**	**19**
1.2.1	Estructura del complejo GPVI/ FcRγ	19
1.2.2	Agonistas de GPVI: endógenos y exógenos	20
1.2.3	Vía de señalización de GPVI	22
1.2.4	Papel de GPVI en trombosis y hemostasia	23
1.2.5	Inhibición de la activación de GPVI	24
1.3	**Proteómica**	**29**
1.3.1	Introducción a la proteómica	29
1.3.2	Diseño experimental en estudios cardiovasculares de proteómica de plaquetas	31
1.3.3	Técnicas de separación de proteínas	34
1.3.3.1	La electroforesis bidimensional diferencial en gel, 2D-DIGE	34
1.3.4	Técnicas analíticas en proteómica: la espectrometría de masas	38
1.4	**Importancia de los estudios de proteómica de plaquetas**	42
1.4.1	Análisis del proteoma total	44
1.4.2	Análisis de las modificaciones postraduccionales	44
1.4.3	Análisis de los subproteomas	46
1.4.4	Proteómica de plaquetas en enfermedades cardiovasculares	49

2. Objetivos 53

3. Material y Métodos 59

3.1 Material 61

3.2 Métodos 62

3.2.1 Selección de muestras 62

3.2.1.1 Características de los pacientes y recogida de muestras 62

3.2.1.2 Características de los donantes sanos y recogida de muestras 63

3.2.2 Aislamiento de plaquetas 64

3.2.3 Activación e inhibición de plaquetas 66

3.2.3.1 Activación para estudios de agregación 66

3.2.3.2 Activación para estudios bioquímicos 66

3.2.3.3 Inhibición de GPVI 67

3.2.4 Precipitación de proteína a partir de lisados de plaquetas para estudios proteómicos por 2D-DIGE 68

3.2.5 Inmunoprecipitación de proteína para estudios proteómicos 68

3.2.6 Preparación de plasmas y aislamiento de microvesículas 69

3.2.7 Cuantificación de proteína 70

3.2.8 Estudios de proteómica 71

3.2.8.1 Electroforesis monodimensional (1D-SDS-PAGE) 71

3.2.8.2 Electroforesis bidimensional 2D-DIGE 71

3.2.8.3 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas 77

3.2.9 Estudios de validación 80

3.2.9.1 Inmunoprecipitaciones 80

3.2.9.2 Inmunodetecciones 80

3.2.10 Análisis estadísticos 83

3.2.11 Análisis de biología de sistemas 84

3.2.12 Estudios para caracterización de MVs 85

3.2.13 Búsqueda de pequeños inhibidores de GPVI 86

4. Resultados 89

4.1 Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST 91

4.1.1 Características de pacientes y controles 91

4.1.2 Caracterización de las microvesículas del plasma 91

4.1.3 Análisis proteómico 2D-DIGE 92

4.1.4 Identificación de proteínas 96

4.1.5 Validación de los resultados 100

4.1.6 Análisis de biología de sistemas 103

4.2 Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo **105**
4.2.1 Características de los pacientes 105
4.2.2 Análisis proteómico 2D-DIGE 105
4.2.3 Identificación de proteínas 108
4.2.4 Validación de los resultados 109
4.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST **114**
4.3.1 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre venosa de pacientes con IAMCEST 114
4.3.1.1 Características de pacientes y controles 114
4.3.1.2 Análisis proteómico 114
4.3.1.3 Identificación de proteínas 117
4.3.1.4 Validación de los resultados. Las formas pTyr de PLCγ2, SLP76, DOK2 y G6F están aumentadas en plaquetas de sangre venosa de pacientes con IAMCEST activadas con CRP 118
4.3.1.5 Estudio piloto de agregación 120
4.3.2 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre arterial de pacientes con IAMCEST 122
4.3.2.1 Características de pacientes 122
4.3.2.2 Inmunodetecciones. Las formas pTyr de PLCγ2, SLP76, DOK2 y G6F están aumentadas en plaquetas de sangre arterial de pacientes con IAMCEST activadas con CRP 123
4.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI **125**
4.4.1 Inhibición de la vía de señalización de GPVI mediante el fragmento Fab del anticuerpo OM2 125
4.4.1.1 Estudios de agregación en donantes sanos 126
4.4.1.2 Estudios bioquímicos en donantes sanos 127
4.4.2 Estudio de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y CRP e inhibición de la misma con inhibidores específicos de los principales receptores de colágeno 128
4.4.3 Búsqueda de pequeños inhibidores de GPVI 129
5. Discusión **133**
5.1 Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST **135**
5.2 Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo **140**

5.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST **145**
5.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI **149**
6. Conclusiones **153**
6.1 Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST **155**
6.2 Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo **156**
6.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST **157**
6.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI **158**
7. Bibliografía **159**
8. Anexos **195**
Anexo I. Composición de tampones y soluciones empleadas. 197
Anexo II. Versiones extendidas de las tablas de características clínicas de los pacientes. Tablas suplementarias 199
Anexo III. Lista de publicaciones realizadas durante el desarrollo de la presente tesis doctoral. Tablas suplementarias 207
Anexo IV. Versiones extendidas de las tablas de proteómica CD
Anexo V. Imágenes de alta resolución, geles 2D-DIGE CD

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de figuras

		Página
Figura 1 -	*Diagrama de la estructura básica de las plaquetas.*	*6*
Figura 2 -	*Fases de activación plaquetaria: adhesión, activación y agregación.*	*11*
Figura 3 -	*Clasificación de las cardiopatías isquémicas.*	*16*
Figura 4 -	*Principales fármacos antiplaquetarios y sus dianas.*	*18*
Figura 5 -	*El receptor de colágeno GPVI.*	*20*
Figura 6 -	*Vía de señalización de la glicoproteína VI (GPVI).*	*22*
Figura 7 -	*Disciplinas científicas que convergen para la formación de la biología de sistemas.*	*30*
Figura 8 -	*Flujo de trabajo esquemático para estudios de proteómica de plaquetas en enfermedades cardiovasculares.*	*33*
Figura 9 -	*Representación esquemática de la técnica 2D-DIGE.*	*37*
Figura 10 -	*Elementos que conforman un espectrómetro de masas.*	*39*
Figura 11 -	*Tipos de espectrómetros de masas comúnmente utilizados en proteómica.*	*40*
Figura 12 -	*Aplicaciones actuales y futuras de la proteómica de plaquetas.*	*43*
Figura 13 -	*Diagrama representativo del método de aislamiento de plaquetas.*	*65*
Figura 14 -	*Proceso de análisis de imagen con SameSpots v4.5.*	*75*
Figura 15 -	*Caracterización de las MVs del plasma.*	*91*
Figura 16 -	*Estimación del porcentaje, en volumen, de cada subpoblación de MVs por dispersión dinámica de luz.*	*92*
Figura 17 -	*Análisis proteómico de alta resolución 2D-DIGE. Comparativa de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST. Imagen representativa de un análisis 2D-DIGE donde se superpone la emisión de los fluoróforos Cy3 y Cy5.*	*94*
Figura 18 -	*Análisis de imagen diferencial. Comparativa de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST. Imagen representativa del análisis en escala de grises.*	*95*
Figura 19 -	*Validaciones por inmunodetección de α2-macroglobulina, fibrinógeno y viperina.*	*102*
Figura 20 -	*Estudio de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST: análisis de redes de las proteínas reguladas diferencialmente mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity systems).*	*103*

Figura 21 - Las proteínas reguladas diferencialmente están directamente relacionadas con infarto y con aterosclerosis. 104

Figura 22 - Análisis de imagen diferencial 2D-DIGE. Comparativa entre el proteoma de plaquetas procedentes de la arteria coronaria obstruida y el proteoma de plaquetas procedentes de la arteria radial. Imagen representativa del análisis en escala de grises. 107

Figura 23 - ITA2B y SKAP2 están sobreexpresadas en las plaquetas intracoronarias de pacientes con IAMCEST. 112

Figura 24 - Figure 24. Validaciones por inmunodetección de TSP-1 y talina-1. TSP-1 y talina-1 están reguladas diferencialmente en las plaquetas intracoronarias. 113

Figura 25 - Análisis de la vía de señalización de GPVI en plaquetas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST: proteínas fosforiladas en residuos tirosina. 116

Figura 26 - La activación de la vía de señalización de GPVI esta aumentada en plaquetas de pacientes con IAMCEST. 119

Figura 27 - La agregación plaquetaria inducida por la activación de GPVI es mayor en pacientes con IAMCEST. 121

Figura 28 - La activación de la vía de señalización de GPVI está aumentada en plaquetas en contacto directo con el trombo. 124

Figura 29 - Porcentaje de agregación inducida por diferentes agonistas. 126

Figura 30 - Porcentaje de agregación tras la inhibición con Fab-OM2. 127

Figura 31 - Análisis bioquímico de la vía de señalización de GPVI: inhibición con diferentes dosis de Fab-OM2 tras la activación plaquetaria con CRP 5µg/mL. 128

Figura 32 - Efecto de los inhibidores de GPVI y α2β1 en la agregación inducida por colágeno y CRP. 129

Figura 33 - Efecto del inhibidor Fab-OM2 en los niveles de calcio intracelular tras la activación plaquetaria con CRP. 130

Índice de tablas

		Página
Tabla 1 -	*Principales receptores plaquetarios: agonistas y características.*	*7*
Tabla 2 -	*Tipos de marcaje para 2D-DIGE: marcaje mínimo y marcaje de saturación.*	*36*
Tabla 3 -	*Lista de materiales utilizados y casas comerciales.*	*61*
Tabla 4 -	*Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunoprecipitaciones e inmunodetecciones.*	*83*
Tabla 5 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de MVs. Versión reducida.*	*93*
Tabla 6 -	*Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de MVs acompañadas de sus identificaciones. Version reducida.*	*96*
Tabla 7 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el las validaciones del estudio de MVs. Versión reducida.*	*100*
Tabla 8 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio proteómico intracoronario. Versión reducida.*	*106*
Tabla 9 -	*Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de intracoronaria acompañadas de sus identificaciones. Versión reducida.*	*108*
Tabla 10 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluídos en las validaciones del estudio intracoronario. Versión reducida.*	*109*
Tabla 11 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión reducida.*	*115*
Tabla 12 -	*Lista de proteínas identificadas en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión reducida.*	*117*
Tabla 13 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio de validación de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión reducida.*	*118*
Tabla 14 -	*Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio piloto de agregación tras la*	*120*

estimulación de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión reducida.

Tabla 15 - Características clínicas de los pacientes con IMACEST incluidos en el estudio de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre arterial. Versión reducida. 122

Tabla supl. 1 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de MVs. Versión extendida. 199

Tabla supl. 2 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el las validaciones del estudio de MVs. Versión extendida. 200

Tabla supl. 3 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio proteómico intracoronario. Versión extendida. 201

Tabla supl. 4 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluídos en las validaciones del estudio intracoronario. Versión extendida. 202

Tabla supl. 5 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión extendida. 203

Tabla supl. 6 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio de validación de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión extendida. 204

Tabla supl. 7 - Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio piloto de agregación tras la estimulación de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión extendida. 205

Tabla supl. 8 - Características clínicas de los pacientes con IMACEST incluidos en el estudio de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre arterial. Versión extendida. 206

Tabla supl. 9 - Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de MVs acompañadas de sus identificaciones. Versión extendida. CD

Tabla supl. 10 - Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de intracoronaria acompañadas de sus identificaciones. Versión extendida. CD

Tabla supl. 11 - Lista de proteínas identificadas en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión extendida. CD

Abreviaturas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1D	Monodimensional
2D	Bidimensional
1-DE	Electroforesis monodimensional (1-Dimensional electrophoresis)
2-DE	Electroforesis bidimensional (*2-Dimensional electrophoresis*)
2D-DIGE	Electroforesis diferencial en gel (*2-Dimensional difference gel electrophoresis*)
5-HT	Serotonina
A2MG	Alfa-2 macroglobulina
AC	Adenilato ciclasa
ACD	Ácido-citrato-dextrosa
ACVA	Acidente cerebrovascular agudo
ADAP	Proteína adaptadora promotora de adhesión y degranulación (*Adhesion and degranulation promoting adaptor protein*) (sinónimos: SLAP-130, FYB)
ADP	Adenosin difosfato (*Adenosin diphosphate*)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Angina de pecho estable
AEBSF	4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo fluoruro clorhidrato
AI	Angina de pecho inestable
AIT	Acidente isquémico transitório
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza (*Analysis of variance*)
APS	Persulfato amónico (*Amonium Persulfate*)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNss	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
ATP	Adenosin trifosfato (*Adenosin triphosphate*)
BSA	Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato] (*3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*)
CK	Creatina quinasa (*Creatine kinase*)
CK-MB	Creatina quinasa isoenzima musculo-cerebro (*Creatine kinase muscle-brain*)
CLEC-2	Receptor de lectinas tipo C 2
cm	Centímetro
CMV	Citomegalovirus
COX	Ciclooxigenasa
CRP	Péptido relacionado con colágeno (*Collagen-related peptide*)
CROIAMCEST	Controles con cardiopatía isquémica crónica estable para los pacientes IAMCEST
DAG	Diacilglicerol
DLS	Dispersión dinámica de luz (*Dynamic light scattering*)
DMF	Dimetilformamida anhidra (*Dimethylformamide*)
Dok-2	Proteína de acoplamiento 2 (*Docking protein 2*)
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sustrato quimioluminiscente (*Enhanced chemiluminescence substrate)*
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (*Ethylene glycol tetraacetic acid*)
ESI	Electrospray (*Electrospray ionization*)
Fab	Fragmento de unión al antígeno (*Fragment antigen-binding*)
Fc	Fragmento cristalizable (Fragment crystallizable)
FACS	Citometría de flujo (Fluorescence-activated cell sorting)
FcRγ	Receptor Fc gamma (*Fragment crystallyzable receptor gamma*)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)
FSC	Parámetro de dispersion que determina el tamaño de partícula en un citómetro de flujo (*Forward scatter*)
FV	Factor de coagulación V
Gads	Proteína adaptadora relacionada con Grb2 (*Grb2-related adaptor protein 2)*
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
GER	Motivo de repetición glicina-acido glutámico-arginina
Grb2	Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento (*Growth factor receptor binding protein 2)*
GPCR	Receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptor*)
GPO	Motivo de repetición glicina-prolina-hidroxiprolina
GPVI	Glicoproteína VI
GPVIs	Glicoproteína VI soluble
HDAC	Histona deacetilasa (Histone deacetylase)
HDACi	Inhibidores de histona deacetilasa (Histone deacetylase inhibitor)
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-pireracinil-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High-performance liquid chromatography)
HTS	Técnicas de cribado de alto rendimiento (*High-throughput screening*)
Hx	Historia de
IAA	Iodoacetamida
IAM	Infarto agudo de miocardio
IAMCEST	Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
IAMSEST	Infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST
IC	Intervalo de confianza
IC50	*Half maximal inhibitory concentration*
ID	Inmunodetección mediante *western-blot*
IEF	Isoelectroenfoque (*Isoelectrofocusing*)
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (*Immobilized-metal affinity chromatography*)
IP	Inmunoprecipitación
IP3	Inositol 3,4,5-trifosfato
IPG	Gradiente inmovilizado de pH (*Immobilized pH gradient*)
IT	Trampa iónica (*Ion Trap*)
ITA2B	Integrin alpha-IIb

ITAM	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina *(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)*
ITIM	Motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
LAT	Adaptador para la activación de las células T (*Linker for activation of T cells*)
LC	Cromatografía líquida (*Liquid chromatography*)
LDL	Lipoproteinas de baja densidad (*Low-density lipoprotein*)
LRR	Receptores ricos en leucina (*Leucine-rich repeat receptors*)
m/z	Relación masa/carga
m/v	Relación masa/volumen
MALDI	Ionización/desorción inducida por láser asistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption ionization*)
Mc	Monoclonal
MOWSE	Método de identificación de proteínas por peso molecular de sus péptidos (*Molecular weight search*)
Mr	Masa molecular relativa
MS	Espectrometría de masas (*Mass spectrometry*)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTB	Tampón de Tyrode modificado (*Modified Tyrode's buffer*)
MVs	Microvesículas
NDSB-256	3-(Etildimetilamonio)propano-1-sulfonato (*3-(Ethyldimethylammonio)propane-1-sulfonate*)
NP-40	Detergente no iónico Nonidet P-40
NO	Óxido nítrico (*Nitric oxide*)
nUPLC	*nano Ultra Performance Liquid Chromatography*
ORF	Marco abierto de lectura (*Open reading frame*)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide gel electrophoresis*)
PAS	Proteína A Sefarosa
PBS	Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
Pc	Policlonal
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
pI	Punto isoeléctrico
PLCγ2	Foafolipasa C gamma 2 (*Phospholipase C gamma 2*)
PMF	Huella de masa peptídica (*Peptide mass fingerprinting*)
PFP	Plasma libre de plaquetas (*Platelet-free plasma)*
PPH	Proyecto proteoma humano
PPP	Plasma pobre en plaquetas (*Platelet-poor plasma*)
PRP	Plasma rico en plaquetas (Platelet-rich plasma)
PS	Fosfatidilserina
PTM	Modificacion postraduccional (*Post-translational modification*)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)
pTyr	Fosforilación en tirosina
Q	Cuadrupolo (*Quadrupole*)
RSAD2	Viperina (Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2)
SCA	Síndrome coronario agudo

SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
SELLEX	Enriquecimiento exponencial en presencia de ligando (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
SDS	Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulphate*)
SH2	Dominio de homología 2 con Src (*Src homology 2*)
SKAP2	Fosfoproteína asociada a la quinasa Src (*Src kinase-associated phosphoprotein 2*) (sinónimo: SKAP-HOM)
SLP-76	Proteína de leucocitos de 76 kDa que contiene un dominio SH2 (*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*)
Src	Tirosina quinasa Src
SSC	Parámetro de dispersión que determina la complejidad de las partículas en un citómetro de flujo (*Side scatter*)
Syk	Tirosina quinasa del bazo (*Spleen tyrosine kinase*)
TLN-1	Talina-1
TBS-T	Tampón Tris salino con Tween 20 (Tris-buffered saline with Tween 20)
TCA	Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*)
TEM	Microscipía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (*Tetramethylethylenediamine*)
TFN-α	Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha)
TiO_2	Dióxido de titanio (*Titanium dioxide*)
TOF	Tiempo de vuelo (*Time of flight*)
TSP-1	Trombospondin-1
TXA_2	Tromboxano A2
v/v	Relación volumen/volumen
vWF	Factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Introducción

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 Plaquetas

La primera aproximación al estudio de las plaquetas data de 1865, cuando Max Schultze detectó en la sangre unas pequeñas esferas incoloras que a menudo tendían a formar grupos entre sí.[1] Fue sin embargo Giulio Bizzozero quien en 1882 publicó un extensísimo trabajo sobre plaquetas, apuntando características tan fundamentales como su falta de núcleo, y demostrando que tenían un papel importante en trombosis.[2]

Desde su descubrimiento, las plaquetas han sido consideradas incapaces de llevar a cabo los procesos de expresión génica regulada y síntesis proteica por su ausencia de núcleo. Sin embargo, en la década de los 60s diversos estudios han demostrado la existencia de un potencial sintético limitado a partir de ARN mensajeros (ARNm) procedentes de los megacariocitos precursores,[3-6] y en los siguientes años se demostró la existencia de ribosomas en las plaquetas y otros componentes necesarios para la síntesis de proteínas.[7,8] Varios estudios han demostrado síntesis proteica *de novo* en plaquetas[7,9,10] y, aunque el nivel de traducción es bajo en las plaquetas en reposo, la activación plaquetaria aumenta la síntesis proteica.[11] En la actualidad se acepta que las plaquetas no sólo tienen el potencial para sintetizar proteínas, sino que esta capacidad parece ser necesaria para cumplir con sus funciones ya que son capaces de expresar productos génicos biológicamente relevantes de forma oportuna y dependiente de señales.[12] Este proceso de traducción utiliza un transcriptoma constitutivo y vías especializadas para alterar el fenotipo de las plaquetas y sus funciones, lo que puede tener gran relevancia clínica.

A pesar de lo dicho, se reconoce que la función plaquetaria depende fundamentalmente de las modificaciones postraduccionales (p*ost-translational modifications*, PTMs) que sufren las proteínas. Así, cuando las plaquetas se activan se ponen en marcha vías de señalización mediadas por PTMs, fundamentalmente fosforilaciones.[13,14] La regulación mediada por PTMs tiene la ventaja de permitir a las plaquetas reaccionar rápidamente ante estímulos externos, lo que es beneficioso en caso de lesión mecánica para evitar la pérdida excesiva de sangre. Sin embargo la naturaleza hipersensible de las plaquetas las hace responder a otros estímulos durante la preparación de muestras, por lo que es fundamental tomar las máximas precauciones durante su manipulación.

1.1.1 Definición y biogénesis

Las plaquetas son células sanguíneas que se caracterizan por su reducido tamaño (2-3 µm de diámetro, ~0,5 µm de espesor y 6-10 fL de volumen) y ausencia de núcleo. En condiciones fisiológicas tienen forma discoidal y circulan por el torrente sanguíneo durante aproximadamente diez días hasta que son destruidas y sustituidas por otras nuevas.[15] Su concentración en sangre oscila entre los 150 y 350x10^6/mL. El origen principal de las plaquetas son los megacariocitos de la médula ósea, células hematopoyéticas poliploides exclusivas de mamíferos que se especializan en su producción y liberación al torrente sanguíneo en un proceso denominado trombopoyesis. Aunque el principal lugar en el que sucede la trombopoyesis es la médula ósea, un número limitado de megacariocitos ha migrado desde su localización inicial, colonizando lugares lejanos en los que se han observado diferentes etapas del desarrollo plaquetario. Estos lugares alternativos en los que tiene lugar la diferenciación plaquetaria a partir de sus progenitores son los pulmones y la sangre. La formación de plaquetas está regulada por la trombopoyetina (hormona sintetizada en hígado y riñones) y su destrucción se realiza por las células de Kupffer en el hígado y por fagocitosis en el bazo.[16]

1.1.2 Subpoblaciones de plaquetas

Entre sus funciones básicas, que son la adhesión a una lesión vascular y la promoción de la generación de trombina, se ha venido asumiendo que todas las plaquetas son igualmente capaces de cumplir la primera. Sin embargo, en la última década varios estudios sugieren una mayor capacidad para promover la generación de trombina por parte de algunas de ellas. Así, dentro de un trombo se distinguen claramente plaquetas con diferentes propiedades de superficie, lo que abre el camino para el estudio de las diferentes subpoblaciones de plaquetas y sus funciones. Recientemente Heemskerk y colaboradores han publicado una revisión interesante en la que describen las diferentes subpoblaciones plaquetarias y sus funciones.[17]

En un trombo, cerca de las fibras de colágeno, existe una población de plaquetas altamente activadas dispuestas a modo de parches. Son conocidas como plaquetas procoagulantes, tienen una estructura redondeada, exponen fosfatidilserina (PS) en su superficie, tienen una morfología inducida por la liberación de calcio sostenida, capacidad de unirse a factores de coagulación y capacidad de generar microvesículas procoagulantes.

Las plaquetas recubiertas (*coated-platelets*) son una subpoblación formada tras la estimulación con colágeno y trombina al mismo tiempo. Aunque esto es cierto, hay estudios

que demuestran la existencia de plaquetas indistinguibles a esta subpoblación, formadas tras la estimulación con otros agonistas o pares de agonistas.[18-21] Este tipo de plaquetas se caracterizan por mostrar en su superficie elevados niveles de proteínas procoagulantes derivadas de gránulos-α (FV, fibrinógeno, trombospondina, vWF), por exponer altos niveles de PS en su superficie, por su capacidad para unirse al FXa y generar un complejo de protrombinasa activo, por unirse a proteínas conjugadas a serotonina, y también por liberar microvesículas. Su importancia fisiológica es aún desconocida, aunque se especula que podrían ser importantes contribuyentes en el proceso trombótico. Desde un punto de vista clínico, se cree que son de gran relevancia para la hemostasia y trombosis, ya que un bajo nivel de plaquetas recubiertas se correlaciona con la aparición de hemorragias cerebrales espontáneas[22] y predisposición al sangrado,[23] mientras que un elevado número parece correlacionarse con ataque isquémico transitorio, infarto cerebral isquémico,[24,25] y con pacientes con una historia de trombosis arterial o venosa.[26] Además, estas plaquetas parecen tener un impacto en el fenotipo de hemorragia en hemofilia,[27] entre otras enfermedades.

En un trombo también se observan plaquetas agregantes que se caracterizan por la presencia de αIIbβ3 (GPIIb/IIIa) activo en su superficie unido a fibrinógeno. Son las responsables de la consolidación y retracción del coágulo.

Una última categoría son las plaquetas apoptóticas y necróticas, caracterizadas por una exposición apoptótica de PS, que parece basarse en la activación de caspasas. Aunque varios estudios *in vitro* han revelado que estas plaquetas tienen un potencial coagulante, su papel en condiciones fisiológicas es cuestionable, ya que son eliminadas rápidamente por las células de barrido presentes en la circulación. Se ha sugerido incluso que estas plaquetas se activan por una vía necrótica de muerte celular.[28]

1.1.3 Estructura de las plaquetas

A pesar de su aparente simplicidad por su reducido tamaño y ausencia de núcleo, las plaquetas son morfológica y bioquímicamente complejas. En cuanto a su estructura, las plaquetas se componen de cuatro zonas bien diferenciadas: la zona periférica, la zona estructural, la zona de organelas y la zona de membranas (Figura 1).

- La zona periférica está formada por el glicocálix y la membrana plasmática, que son el primer contacto con el exterior. El glicocálix funciona a modo de intermediario entre la plaqueta y el entorno, detectando los cambios en la vasculatura. La membrana posee

innumerables receptores proteicos que interaccionan con agonistas externos desencadenando las diversas reacciones plaquetarias.

- La zona estructural se compone por el sistema de microtúbulos que soportan el citoesqueleto, y por el sistema de microfilamentos de actina y miosina que lo forman, confiriendo a las plaquetas la capacidad de cambiar de forma cuando se activan.
- La zona de organelas incluye depósitos de glucógeno, lisosomas cargados de enzimas hidrolíticos, gránulos densos que contienen pequeñas moléculas involucradas en los procesos de señalización (ADP, ATP, 5-HT y Ca^{2+}) y gránulos alfa que contienen proteínas esenciales para llevar a cabo las funciones plaquetarias.
- Los sistemas de membrana incluyen el sistema canalicular abierto, aberturas o conductos membranosos que se prolongan desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula, y el sistema tubular denso derivado del retículo endoplasmático rugoso de los megacariocitos. Este último sistema es un depósito importante de iones de calcio libres, esenciales para la regulación de la activación y metabolismo de las plaquetas.

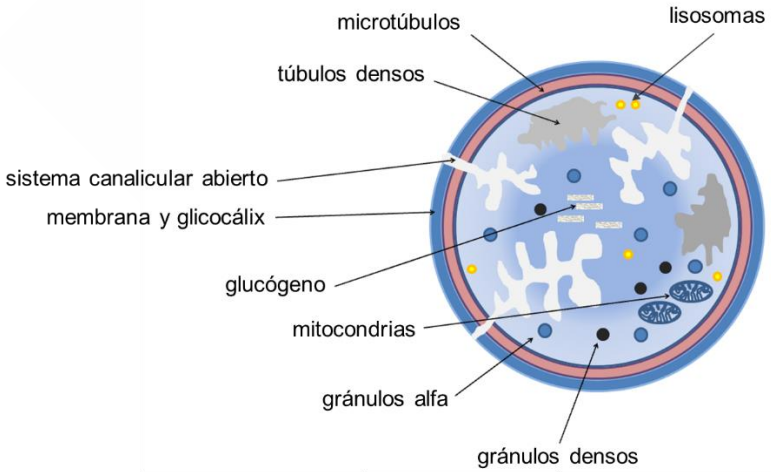


Figura 1. Diagrama de la estructura básica de las plaquetas.

1.1.4 Receptores plaquetarios

En la membrana de las plaquetas se localizan receptores de muy diversos tipos que establecen interacciones entre plaquetas adyacentes y con el medio externo, determinando su reactividad con un amplio rango de agonistas y proteínas adhesivas. Entre los principales tipos de receptores plaquetarios encontramos los receptores de la familia de las integrinas, los receptores ricos en leucina (*leucine-rich repeat receptors*, LRR), los receptores transmembrana ligados a proteína G, las proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, los receptores de tipo tirosina quinasa y las lectinas. Los principales

receptores plaquetarios y sus agonistas se muestran en la Tabla 1. Más adelante nos centraremos en el receptor de colágeno GPVI, objeto especial de estudio de esta tesis doctoral.

Tabla 1. Principales receptores plaquetarios: agonistas y características.

Receptor plaquetario	***Agonista***	***Tipo de receptor***	***Vía de señalización***
GPVI	Colágeno, CRP	Ig	Tirosina quinasa
α2β1	Colágeno	integrina	Tirosina quinasa
GPIb-V-IX	vWF, trombina	Rico en leucina	Tirosina quinasa
αIIbβ3	Fibrinógeno, vWF	Integrina	Tirosina quinasa
$P2Y_1$	ADP	GPCR	$G\alpha_q$
$P2Y_{12}$	ADP	GPCR	$G\alpha_i$
PAR-1	Trombina	GPCR	$G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$
PAR-4	Trombina	GPCR	$G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$
TP	Tromboxano A2	GPCR	$G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$

Ig: inmunoglobulina, CRP: péptido relacionado con colágeno (*collagen-related peptide);* GPCR: receptor acoplado a proteína G (*G-protein coupled receptor*); vWF: factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*).

1.1.5 Principales vías de secreción plaquetaria

La secreción plaquetaria, el secretoma, es el conjunto de proteínas y otras biomoléculas liberadas por las plaquetas activadas. Las proteínas constituyentes de este producto liberado se asocian con inflamación, coagulación, angiogénesis, crecimiento celular y adhesión celular.[29-33] Se sabe que la secreción de plaquetas es heterogénea y dependiente de agonista,[34,35] lo que resulta relevante en diferentes contextos patológicos. Un ejemplo de su relevancia patológica es la presencia de proteínas plaquetarias en la placa aterosclerótica humana, lo que indica que el secretoma podría estar contribuyendo a la patogénesis de la aterosclerosis.[36,37] Como se explica a continuación, la liberación de proteínas por parte de una célula puede suceder por vía clásica o por vías alternativas.

1.1.5.1 Vía clásica de secreción de proteínas

En la vía clásica de secreción las proteínas destinadas al exterior celular son dirigidas por una secuencia o péptido señal. Estas proteínas viajan incluidas en vesículas desde el retículo endoplásmico hasta el Golgi para fusionarse finalmente con la membrana celular y liberar

su contenido. Este es el mecanismo de liberación del contenido de los gránulos plaquetarios a consecuencia del aumento de Ca^{2+} citosólico que se produce cuando las plaquetas son estimuladas con agonistas fuertes. Los gránulos alfa contienen proteínas esenciales para llevar a cabo las funciones plaquetarias, mientras que los gránulos densos contienen pequeñas moléculas involucradas en los procesos de señalización. Ambos tipos de gránulos derivan de los cuerpos multivesiculares de los megacariocitos.[38] Se ha demostrado la existencia de distintos subtipos de gránulos α con distinto contenido proteico que son liberados de forma diferencial en función del estímulo.[39] En cuanto a su función, los gránulos de plaquetas contribuyen a la propagación de la activación plaquetaria, y por otra parte, a procesos tales como coagulación, defensa del huésped, angiogénesis, cicatrización de heridas e inflamación.[40]

1.1.5.2 Vías alternativas de secreción de proteínas. Microvesículas e importancia de su estudio

Alternativamente la secreción puede tener lugar por rutas no clásicas en la que las proteínas no utilizan el camino clásico de secreción ya que carecen de una secuencia señal que las dirija. Un tipo importante de secreción no clásica es la liberación de vesículas extracelulares que incluyen las microvesículas (MVs), los exosomas y los cuerpos apoptóticos.

Las microvesículas del plasma son fragmentos citoplasmáticos de menos de una micra rodeadas de membrana celular, que se originan fundamentalmente a partir de células sanguíneas, endoteliales, tumorales y esqueléticas. Son liberadas por gemación de la membrana plasmática, e inducidas por apoptosis o activación de las plaquetas. Su contenido y función es específico, y depende directamente de la célula parental que las liberó y del mecanismo que desencadenó su liberación. Representan un importante modo de comunicación intercelular al servir como vehículos para la transferencia de proteínas a través de las membranas,[41] pero además están involucradas en muchas otras funciones tales como coagulación, inflamación, trombosis, comunicación intercelular y progresión tumoral. Se sabe que las plaquetas activadas generan microvesículas[42,43] que liberan al plasma contribuyendo al aumento de las microvesículas plasmáticas. Aproximadamente el 90% de las microvesículas del plasma proceden de plaquetas[44] y son liberadas a la circulación junto con vesículas más pequeñas, los exosomas. Las microvesículas tienen papeles importantes en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias tales como la aterosclerosis[45] y su número está aumentado en la sangre de pacientes con síndromes coronarios agudos,[46-48] diabetes[49] y sepsis,[50] entre otras enfermedades.

1.1.6 Función plaquetaria

El papel principal de las plaquetas en el mantenimiento de la hemostasia corporal fue descubierto hace ya más de un siglo.[2] Sin embargo, hoy en día se sabe que están implicadas en muchas otras funciones biológicas cruciales al margen de la hemostasia, algunas beneficiosas como el mantenimiento de la integridad vascular, y otras patológicas como inflamación, inmunidad, cáncer, trombosis o enfermedades cardiovasculares.[51]

1.1.6.1 Funciones fisiológicas de las plaquetas

- **Papel de las plaquetas en hemostasia**

La hemostasia, definida como mecanismo de defensa del organismo que se activa para evitar la pérdida de sangre en el sistema circulatorio, es la función más relevante de las plaquetas. En condiciones fisiológicas, cuando el endotelio de algún vaso sanguíneo sufre una lesión (por traumatismo, intervención quirúrgica o enfermedad), se exponen a la luz del mismo los componentes de la matriz subendotelial desencadenando la activación plaquetaria para iniciar la formación de un tapón hemostático. El proceso de activación plaquetaria consta de tres fases (adhesión, activación y agregación) e implica numerosos receptores (Figura 2).

- Adhesión. En ausencia de daño la superficie interna de los vasos sanguíneos está revestida por una capa delgada de células endoteliales que actúan inhibiendo la activación de las plaquetas mediante la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina I2 (PGI2) que actúan de modo sinérgico.[52-54] Estas células también presentan actividad ecto-ADPasa (CD39) que se encarga de metabolizar el ADP (activador plaquetario) en adenosina (inhibidor plaquetario).[55,56] La actuación coordinada de estos tres mecanismos inhibe la activación y el cambio de forma de las plaquetas. Cuando se produce una lesión vascular estos mecanismos inhibitorios se ven alterados y los componentes de la matriz subendotelial se exponen a la luz del vaso sanguíneo desencadenando la activación plaquetaria que conduce a la formación de un tapón hemostático para evitar la pérdida excesiva de sangre. La activación se inicia con la liberación de la proteína multimérica factor de von Willebrand (*von Willebrand factor,* vWF) por parte de las células endoteliales, y su unión al colágeno expuesto formando una interacción transitoria e inestable con el complejo receptor GPIb-V-IX. Esta interacción ralentiza la velocidad de las plaquetas, facilitando la formación de una

adhesión más estable por interacción entre la integrina α2β1 y colágeno. En esta fase resulta fundamental la formación de pequeñas cantidades de trombina.

- Activación. Consiste en dos etapas que desencadenan la activación irreversible de las plaquetas. La primera se inicia con la interacción entre el colágeno y el receptor específico de plaquetas glicoproteína VI (GPVI). La interacción colágeno-GPVI promueve la clusterización del receptor y la iniciación de una cascada de señalización que funciona a través de tirosina quinasas. Dicha cascada finaliza en la activación de la fosfolipasa C gamma 2 (PLCγ2) que cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol 3,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), desencadenando un aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. Todo este proceso concluye con la liberación del contenido de los gránulos α y densos por parte de las plaquetas, que actúan como factores de refuerzo positivo de modo autocrino y paracrino. Estos factores (fibrinógeno, vWF, ADP, TXA_2, serotonina, factores de coagulación, etc.), junto con la trombina generada en la superficie de las plaquetas, inician la segunda etapa de activación por retroalimentación positiva, reclutando nuevas plaquetas al lugar de la lesión e iniciando la agregación plaquetaria por medio de la interacción fibrinógeno-integrina αIIbβ3[16,57,58] en un proceso denominado señalización "dentro-fuera" (*inside-out*).[57] El aumento de calcio citoplasmático causa además la activación de la fosfolipasa A2, la cual se encarga de liberar ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana, que es convertido en TXA_2 por acción de la ciclooxigenasa (COX) y tromboxano sintasa.[59]

- Agregación. El proceso de señalización "dentro-fuera", fundamentalmente la movilización del calcio intracelular, produce un cambio de conformación en la integrina αIIbβ3 aumentando la afinidad por sus ligandos: fibrinógeno y vWF. La integrina comienza entonces a establecer conexiones entre plaquetas adyacentes mediante interacciones bivalentes con el fibrinógeno. La activación de la integrina, por su parte, produce una señalización "fuera dentro" (*outside-in*) que amplifica el proceso de activación plaquetaria y conduce a la remodelación del citoesqueleto de actina.[60] En esta etapa las plaquetas pierden su forma discoide, emitiendo espículas (filopodios y lamelipodios) por medio de las cuales se adhieren al tejido circundante.[61]

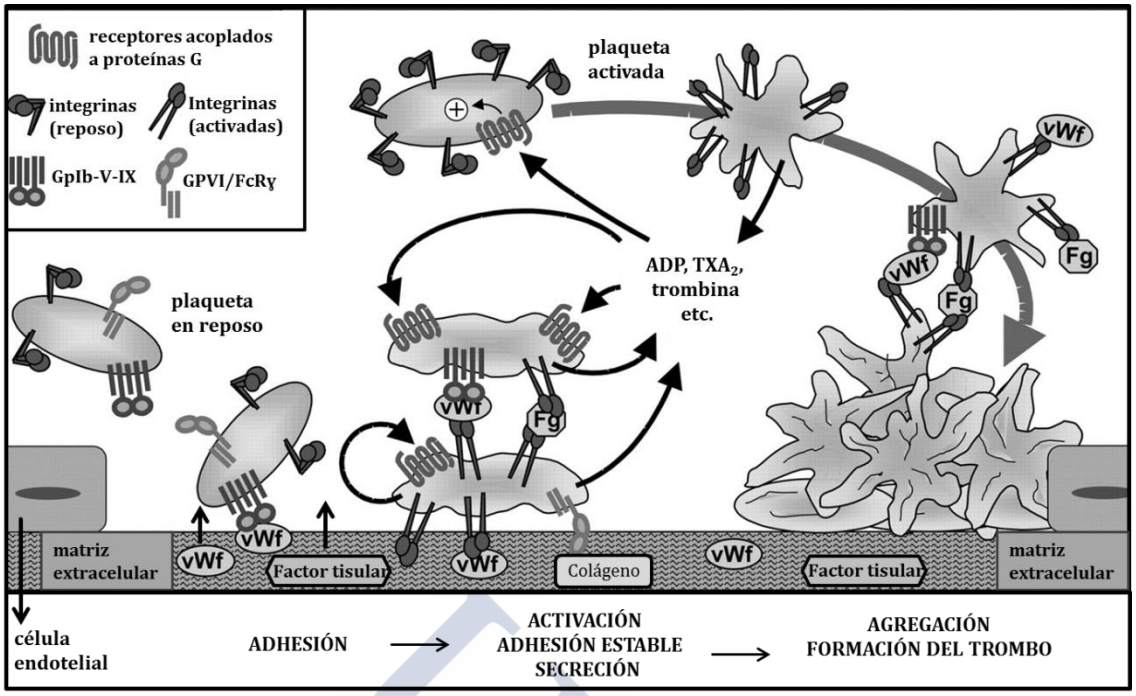


Figura 2. Fases de activación plaquetaria: adhesión, activación y agregación. *Ilustración adaptada de Stefan Offermanns et al.* [62]

- **Papel de las plaquetas en el mantenimiento de la integridad vascular**

Otro cometido de las plaquetas es preservar la función semipermeable del endotelio, siendo consideradas como guardianes críticos del mantenimiento de la integridad vascular. La primera evidencia de esta función plaquetaria fue descrita por Danielli en 1940, cuando señaló que las plaquetas ayudan a preservar la función de barrera del endotelio durante la perfusión de órganos.[63] Estudios posteriores demostraron que las plaquetas mantienen continuamente la función de barrera del endotelio en reposo,[64,65] y en condiciones de inflamación impiden o curan lesiones vasculares causadas por los leucocitos infiltrantes. Los mecanismos plaquetarios implicados en el mantenimiento de la integridad vascular no sólo implican el proceso de formación del trombo, sino también la secreción de los gránulos de las plaquetas. Ho-Tin-Noé ha publicado una revisión muy completa sobre este tema.[66]

1.1.6.2 Funciones patológicas de las plaquetas

La activación plaquetaria es un arma de doble filo al interaccionar con todo tipo de daño vascular. Desde un punto de vista patológico, la activación no deseada de las plaquetas está involucrada en dolencias tales como las enfermedades trombóticas, uremia, síndrome de depósito de gránulos delta (δ-*storage pool disease)*, enfermedades neurodegenerativas o fibrosis quística.

- **Papel de las plaquetas en inmunidad**

Del mismo modo que las plaquetas son capaces de detectar un daño en el endotelio al contactar con moléculas subendoteliales, también son capaces de detectar daños causados por la presencia de patógenos o estructuras derivadas de patógenos durante situaciones de infección e inflamación. Se sabe que existe una relación estrecha entre plaquetas e inmunidad, por la sofisticada interacción existente entre plaquetas y bacterias. Por ejemplo, la trombocitopenia (disminución relativa de plaquetas en sangre) sucede con frecuencia durante los procesos de sepsis[67] al mismo tiempo que la sepsis es un factor de riesgo importante para la trombocitopenia en pacientes críticos.[68] Durante una infección bacteriana la interacción directa entre plaquetas y bacterias conduce a un aumento de la macrofagia que contribuye a la trombocitopenia. En este contexto cabe mencionar que las plaquetas presentan propiedades estructurales y funcionales que indican sus múltiples roles en inmunidad, como receptores quimiotácticos que las dirigen al lugar de la infección,[69-71] receptores de anticuerpos que promueven su interacción con microorganismos o toxinas derivadas de los mismos,[72-75] formación de metabolitos tóxicos del oxígeno con potente actividad antimicrobiana[76,77] o secreción de péptidos y proteínas antimicrobianas.[78-80] En este sentido, las plaquetas pueden ser definidas como células de inmunidad innata especializadas en actividades proinflamatorias.

Las plaquetas, por herencia de los megacariocitos, expresan ligandos que unen estructuras extrañas, expresan receptores que facilitan la ingestión de patógenos para inhibirlos o destruirlos, secretan un gran número de factores relacionados con la comunicación intercelular que median acciones locales como la inflamación, y también son capaces de detectar y responder a diferentes señales y adaptar su respuesta en función del daño al que se enfrentan.[81] La habilidad de las plaquetas para diferenciar entre patógenos se debe a la presencia de sensores y ligandos de patógenos en su superficie. Los receptores funcionales que detectan los patógenos permiten a las plaquetas unirse a invasores microbianos y combatirlos de forma específica. Se ha demostrado recientemente que las plaquetas humanas son capaces de discriminar entre varias isoformas de lipopolisacáridos bacterianos conduciendo a una secreción diferencial de moléculas.[82]

- **Papel de las plaquetas en inflamación**

Existen evidencias importantes de que las plaquetas promueven de manera activa los procesos inflamatorios. En las primeras etapas de la inflamación, la activación endotelial conduce a la extravasación de leucocitos y su adhesión a las células endoteliales en un proceso dependiente de receptores. Tras esto, las plaquetas son reclutadas inmediatamente

a lugares de daño e infección. La inflamación conduce a un desequilibrio entre las condiciones procoagulantes y anticoagulantes del endotelio. El efecto procoagulante es mediado por TFN-α, la primera citoquina proinflamatoria secretada en el lugar de una infección, mientras que los efectos anticoagulantes están mediados por el óxido nítrico que, como ya se ha mencionado, es un potente inhibidor de la activación plaquetaria.

El primer hecho que sugiere que las plaquetas juegan un papel importante en la inflamación viene de observaciones relacionadas con la aterosclerosis, proceso inflamatorio crónico caracterizado por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad de las arterias. Este engrosamiento per se obstaculiza el flujo sanguíneo, pero el verdadero problema surge cuando en una placa vulnerable se produce una fisura, erosión o rotura, exponiendo su contenido a la luz arterial. La acumulación subendotelial de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inicia la activación de las células endoteliales caracterizada por la pérdida de la integridad vascular, la producción de citoquinas y la expresión y liberación de moléculas adhesivas de leucocitos,[83] desencadenando los subsecuentes procesos de inflamación. El papel que desempeñan las plaquetas en las primeras etapas de la aterosclerosis fue inicialmente reconocido por Steinhubl y Moliterno[84] y reforzado por la caracterización del secretoma plaquetario que contiene muchas proteínas con importantes propiedades proinflamatorias.[85] Además, varios grupos se han centrado en el estudio de la adhesión de las plaquetas quiescentes a las células endoteliales activadas avalando el importante papel que juegan las plaquetas en los procesos ateroscleróticos.[36,86,87]

La contribución de las plaquetas a la inflamación asociada con otros desordenes ha sido menos estudiada, pero se sabe que están relacionadas con muchas otras condiciones inflamatorias como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematosos sistémico, migraña, enfermedad inflamatoria pulmonar y psoriasis. Este tema ha sido ampliamente revisado por McNicol e Israelis en los últimos años.[88]

- **Papel de las plaquetas en procesos cancerígenos**

La relación entre plaquetas y cáncer fue descrita por primera vez en 1865 cuando Armand Trousseau observó que la tromboflebitis migratoria podría ser un indicador de malignidad.[89] Desde entonces, innumerables trabajos se han centrado en estudiar el papel que desempeñan las plaquetas en la malignidad celular. Hoy en día existe un amplio conocimiento de la interacción bidireccional existente entre plaquetas y células tumorales. Las plaquetas promueven la supervivencia y progresión tumoral formando agregados con las células tumorales, lo que les confiere una ventaja de supervivencia[90,91] ya que las protege de la vigilancia del sistema inmune[92,93] y aumenta su potencial metastático.[94] Además, las plaquetas facilitan la adhesión[95] y la invasión[96] de células tumorales en la pared de los vasos.

Por otro lado, las plaquetas secretan factores de crecimiento que pueden aumentar o mejorar el crecimiento de las células tumorales[97-99] y factores de crecimiento de la angiogénesis que son requeridos para la angiogénesis tumoral, crecimiento y metástasis.[95,100,101] Por último, las proteínas expresadas por las células tumorales son capaces de activar plaquetas, y esta capacidad varía entre líneas celulares tumorales.[88]
Un ejemplo interesante es la elevada expresión de podoplanina detectada en algunas líneas tumorales. La podoplanina es una glicoproteína que actúa a modo de ligando endógeno del receptor plaquetario CLEC-2. Esta glicoproteína se expresa en una amplia variedad de tejidos, pero se encuentra particularmente elevada en algunos tumores en cuya metástasis está implicada.[102] Se sabe además que las células tumorales que expresan podoplanina inducen la agregación plaquetaria.[103]

- **Papel de las plaquetas en trombosis y enfermedades cardiovasculares**

Como se ha explicado anteriormente, las plaquetas contribuyen a la activación endotelial y modulan respuestas inflamatorias favoreciendo el inicio y la formación de lesiones ateroscleróticas y sus posteriores complicaciones trombóticas.[104-106] Cuando en una placa de ateroma vulnerable se produce una lesión, los componentes protrombóticos de la placa se exponen a la luz del vaso y promueven la formación de un trombo en el lugar de la lesión, originando una isquemia que puede ocasionar necrosis. La aterosclerosis tiende a asentarse en las arterias coronarias manifestándose por la aparición de síndromes coronarios agudos o muerte súbita. Otro asentamiento frecuente son las arterias carótidas, vertebrales y cerebrales, en donde cursa como un accidente cerebrovascular agudo (ACVA) o como un accidente isquémico transitorio (AIT). Cuando el asentamiento son las arterias ilíacas y femorales que irrigan las extremidades inferiores del cuerpo, la expresión clínica es la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores.[107]

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo según datos de la Organización Mundial de la Salud,[108] razón por la cual la investigación cardiovascular es de gran relevancia. En las últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios clínicos y básicos debido a la urgente necesidad de arrojar luz sobre los complejos mecanismos que subyacen estas enfermedades y su progreso. Las enfermedades cardiovasculares comprenden una serie de condiciones que afectan a la estructura o función del sistema cardiovascular, incluyendo enfermedades de los vasos, arritmias, insuficiencia cardíaca, enfermedades de las válvulas del corazón, enfermedad cardíaca congénita, cardiomiopatía, enfermedad pericárdica y enfermedad aórtica. En los últimos años se ha

realizado un gran progreso en el estudio de estas enfermedades, pero todavía hay una gran necesidad de avanzar en la comprensión de su fisiopatología.

Existen muchos factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares que no se pueden modificar, como son los antecedentes familiares de enfermedad cardíaca, el origen étnico o la edad. Otros factores de riesgo potencialmente modificables incluyen tabaquismo, hipertensión arterial sistémica, hipercolesterolemia, obesidad, dislipidemia, sedentarismo, diabetes mellitus, dietas poco saludables y uso excesivo de alcohol.[109]

La cardiopatía isquémica es el tipo más común de enfermedad cardiovascular y la causa principal de los ataques al corazón. Se define como la enfermedad causada por la aterosclerosis de las arterias coronarias que provoca el estrechamiento (estenosis) de las mismas. Es un proceso iniciado en las primeras etapas de vida, pero que no comienza a manifestarse hasta que la estenosis es tan grave que causa un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno y nutrientes por parte del miocardio. Es entonces cuando se produce una isquemia miocárdica. Esta isquemia puede deberse únicamente al estrechamiento de la luz del vaso provocada por el engrosamiento de la placa, lo que se conoce como angina de pecho estable o crónica (AE) que se manifiesta como un patrón predecible de dolor en el pecho debido un estrechamiento de una de las arterias; o puede complicarse con la ruptura de la placa aterosclerótica seguida por la formación de un trombo en el lugar de la lesión, bloqueando parcial o totalmente el flujo de sangre y traduciéndose en necrosis del tejido irrigado por dicha arteria. Esto se conoce como síndrome coronario agudo (SCA) y se caracteriza por la manifestación de un conjunto de síntomas clínicos relacionados con la isquemia miocárdica aguda.

Los síndromes coronarios agudos se subdividen a su vez en infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST (IAMSEST), infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) y angina inestable (AI). Existen diferencias en la composición de los trombos de las arterias coronarias en cada condición. Un IAMSEST se inicia con el estrechamiento de la arteria coronaria, debido al desarrollo de un trombo blanco rico en plaquetas que normalmente no es del todo oclusivo.[110] Se diagnostica por la no detección de la elevación del segmento ST en un electrocardiograma, y por el aumento de biomarcadores de necrosis cardiaca (troponinas y una isoforma de la enzima creatina fosfoquinasa). En el caso de los IAMCEST, el evento comienza con un estrechamiento completo y prolongado de una arteria coronaria que implica la formación de un trombo rojo rico en fibrina que se superpone al trombo blanco subyacente.[110] Se debe probablemente a una ruptura mayor de la placa aterosclerótica,[111] y se diagnostica por presentar una elevación en el segmento ST al

observar un electrocardiograma y por el aumento de marcadores de necrosis miocárdica. Por último, la AI se caracteriza por la aparición de un trombo no oclusivo[112] y la ausencia de liberación detectable de las enzimas y biomarcadores de necrosis miocárdica. En la Figura 3 se muestra un diagrama clasificatorio de los tipos de cardiopatía isquémica.

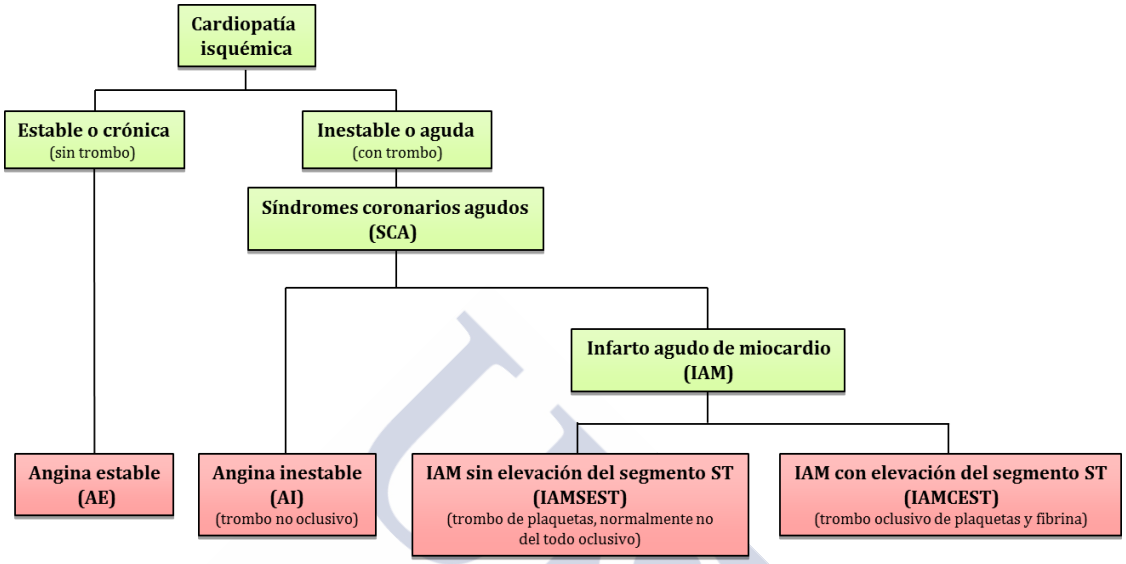


Figura 3. Clasificación de las cardiopatías isquémicas.

Un buen diagnóstico y estratificación de los pacientes es crucial para el manejo de pacientes con SCA. El objetivo fundamental en el manejo de los pacientes que presentan dolor torácico es clasificarlos de forma eficiente, rápida y precisa. Es el médico quien tiene el reto de identificar cual es el tratamiento más adecuado en cada caso.

Es bien sabido que las plaquetas desempeñan un papel fundamental en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a muchas enfermedades cardiovasculares, especialmente en los SCA, ya que están implicadas en la formación del trombo tras la ruptura de la placa de ateroma.[113] Esta es la razón por la cual las moléculas implicadas en la activación y agregación plaquetaria son los objetivos principales para el tratamiento de los SCA.[114] Se han destinado innumerables esfuerzos a la búsqueda de fármacos que inhiban la activación de las plaquetas. Sin embargo, muy a menudo es difícil separar los beneficios terapéuticos de los efectos nocivos de los fármacos, ya que tanto la acción fisiológica de las plaquetas como la patológica se deben a los mismos mecanismos, y es aquí donde radica la importancia de avanzar en la búsqueda de fármacos antiplaquetarios efectivos para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.[115]

Principales dianas y fármacos antiplaquetarios utilizados en el tratamiento de SCAs

Existen algunos agentes antiplaquetarios utilizados rutinariamente en el tratamiento de los SCA. Los inhibidores de la ciclooxigenasa-1 (como la *aspirina*) actúan reduciendo drásticamente la mortalidad por infarto de miocardio, el riesgo de recurrencia de eventos cardiovasculares posteriores y las complicaciones isquémicas debido a las intervenciones coronarias percutáneas.[116,117] Otros medicamentos incluyen tienopiridinas (como clopidogrel o ticagrelor) que son antagonistas del receptor de ADP, $P2Y_{12}$, y los inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa (tales como abciximab o epifibatide). La combinación de inhibidores de la ciclooxigenasa-1 y tienopiridinas se utiliza rutinariamente en la prevención y el tratamiento de los SCAs.[118] Las directrices actuales sobre la intervención coronaria percutánea recomiendan la administración de dos antiagregantes plaquetarios,[119] pero surgen dudas a la hora de establecer un tiempo óptimo de administración del tratamiento tras el infarto. Un tratamiento prolongado con dos o tres antiagregantes puede desarrollar dos respuestas: por un lado podría conducir a una respuesta hipo-reactiva de las plaquetas, que finalizaría con la aparición de una resistencia a dichos fármacos,[120,121] y por otro lado a una respuesta hiper-reactiva de las plaquetas que desencadenaría un aumento del riesgo de sangrado.[122] Por el contrario, un tratamiento excesivamente corto podría provocar eventos recurrentes en el paciente.

Por razones evidentes el estudio y desarrollo de nuevos agentes antiplaquetarios como inhibidores más potentes de los receptores $P2Y_{12}$ y GPIIb/IIIa, así como de nuevos fármacos contra receptores todavía no inhibidos como GPVI, se encuentra en auge. El fin último de estos estudios es encontrar el modo de disminuir los eventos aterotrombóticos recurrentes sin aumentar el riesgo de hemorragia. Los principales fármacos antiplaquetarios y sus dianas celulares se muestran en la Figura 4.

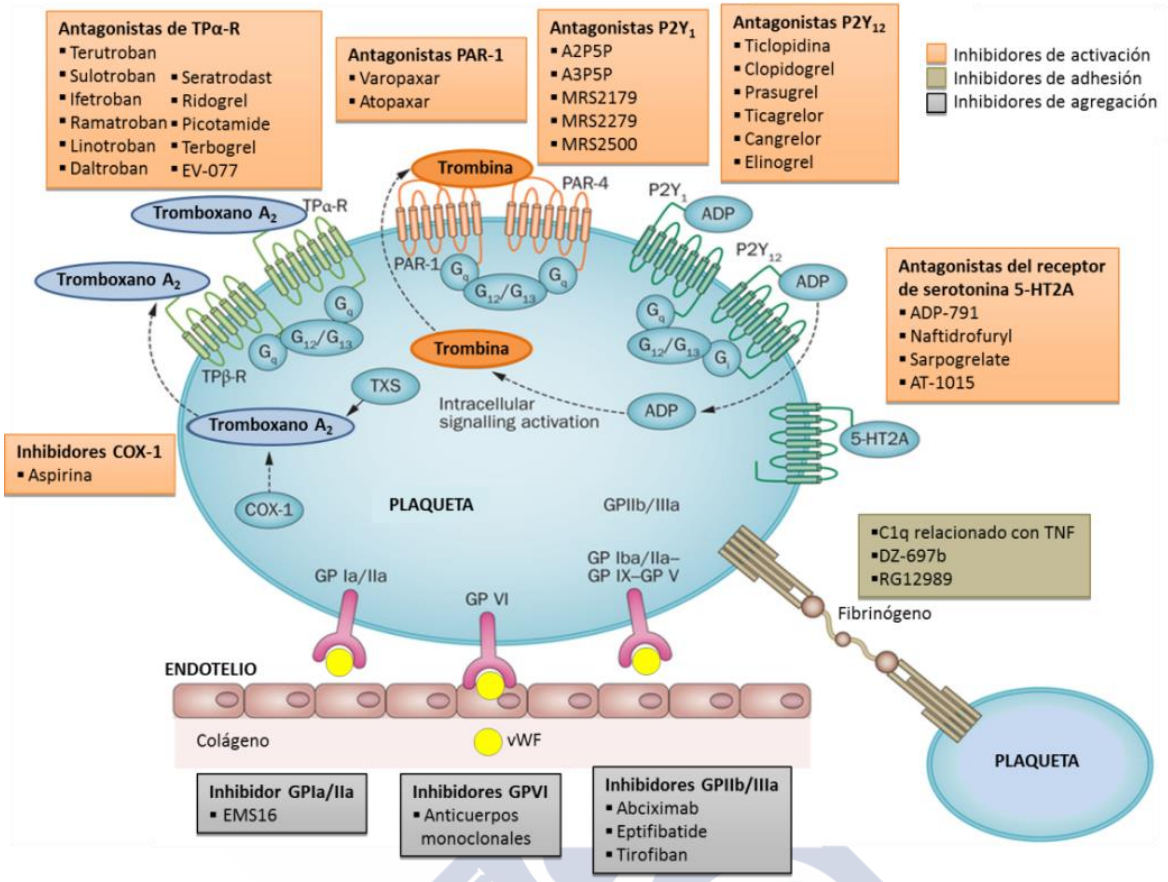


Figura 4. Principales fármacos antiplaquetarios y sus dianas. *Ilustración adaptada de Francesco Franchi y Dominick J. Angiolillo.*[123]

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 El receptor de colágeno GPVI: función y relevancia como diana farmacológica

La glicoproteína VI (GPVI) es una de las inmunoglobulinas más importantes en plaquetas y, junto con α2β1, es uno de los principales receptores de colágeno. Su expresión se restringe únicamente a plaquetas y megacariocitos, y se ha estimado que existen entre 4000 y 6000 copias de GPVI en la superficie de las plaquetas.[124-127] Su activación desencadena una vía de señalización que funciona a través de fosforilaciones en los residuos tirosina de las proteínas que conforman dicha vía.

Este receptor se identificó inicialmente como una glicoproteína de membrana plaquetaria de unos 60-65 kDa y función desconocida.[128] El primer indicio de su papel como receptor de colágeno en plaquetas provino del estudio de un paciente con trombocitopenia autoinmune causada por los autoanticuerpos de una proteína de 65 kDa que estaba presente en individuos sanos, pero ausente en este paciente.[129] Las plaquetas de este paciente eran insensibles al colágeno mientras que la activación por otros estímulos era normal. Se han descrito a posteriori casos de pacientes con bajos niveles de GPVI que presentaban un fenotipo de sangrado leve y cuyas plaquetas eran defectuosas en la agregación por colágeno.[130-132] Por otro lado, la depleción de GPVI utilizando un anticuerpo monoclonal selectivo anti GPVI conduce a una deficiencia transitoria sin afectar a otros receptores, inhibiendo la agregación inducida por colágeno y por agonistas específicos de GPVI en plaquetas normales de ratón.[133] El conjunto de estos estudios pone de manifiesto la importancia de GPVI como receptor de colágeno.

1.2.1 Estructura del complejo GPVI/ FcRγ

La glicoproteína VI humana está formada por 339 aminoácidos que se distribuyen formando dos dominios Ig extracelulares, un único domino transmembrana y una cola citoplasmática corta.[134] La estructura cristalina del receptor humano GPVI (PDB ID.2GI7) fue publicada por Horii K y colaboradores en el año 2006 y se muestra en la Figura 5A.[135] El dominio extracelular está formado por dos bucles C2 responsables de la interacción con el colágeno, uno de los cuales presenta un lugar único de N-glicosilación. Además presenta un cuello mucilaginoso fuertemente O-glicosilado rico en residuos serina y treonina, que eleva los dominios C2 y los aleja de la membrana para hacerlos accesibles al colágeno. El dominio transmembrana tiene como tercer residuo una arginina que forma un puente salino con un ácido aspártico del dominio transmembrana de la cadena γ del receptor Fc (FcRγ),

estabilizando el complejo GPVI/FcRγ, lo que resulta crítico para el proceso de señalización.[136] El dominio citoplasmático contiene un lugar de unión a calmodulina y una región rica en prolina que se une selectivamente a miembros de la familia Src (Lyn y Fyn) fundamentales para la activación de la vía. La cola citosólica de FcRγ contiene una copia del motivo atípico de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) que es fosforilado durante el proceso de activación. La estructura del complejo GPVI/FcRγ se muestra en la Figura 5B.

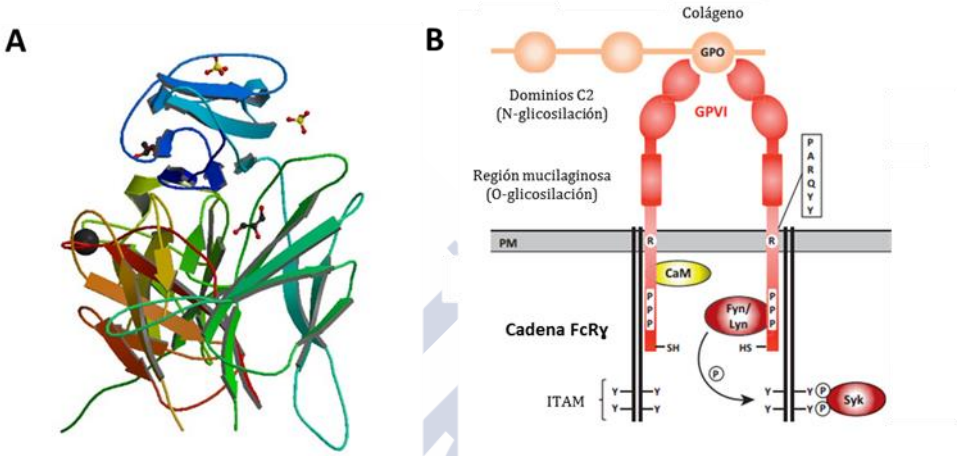


Figura 5. El receptor de colágeno GPVI. *A) estructura cristalina del receptor GPVI. Imagen de Horii K y colaboradores.[135] B) Representación de la estructura del complejo GPVI/FcRγ. Ilustración adaptada de Sebastian Dütting et al.[137]*

1.2.2 Agonistas de GPVI

- **Agonistas endógenos**

De las más de 20 formas de colágeno existentes, los tipos fibrilares I y III son los principales componentes de la matriz extracelular de los vasos sanguíneos. El colágeno es uns superhélice dextrógira formada por la asociación de tres cadenas peptídicas ricas en glicina (G), prolina (P) e hidroxiprolina (O), entre otros aminoácidos. El motivo de repetición GPO (glicina-prolina-hidroxiplolina) es la secuencia específica que activa GPVI,[138] mientras que el motivo GER (glicina-ácido glutámico-arginina) es específico para la activación de α2β1.[139] En la década de los 90, el grupo de Morton y el de Santoro propusieron independientemente que la activación de las plaquetas por colágeno sucedía por la combinación de dos receptores, lo que se conoce como el modelo de activación plaquetaria en dos fases: una primera fase de adhesión mediada por α2β1 y una segunda fase de activación mediada por un receptor desconocido, que resultó ser finalmente GPVI.[140-141]

También se sabe que la laminina de la membrana basal es uno de los primeros ligandos que entran en contacto con las plaquetas cuando se produce una lesión y que actúa activando GPVI; sin embargo, su baja afinidad por el receptor hace pensar que su función es la de sellar pequeñas heridas en los vasos sanguíneos en las que no se requiere la formación de un trombo oclusivo.[142] Por último, también se ha demostrado que la adiponectina globular juega un papel en la activación de GPVI, pero su relevancia fisiológica no está del todo clara ya que los niveles circulantes de esta hormona son insuficientes para desencadenar la activación plaquetaria.[143]

- **Agonistas exógenos**

Existen varias moléculas que actúan a modo de agonistas exógenos de GPVI, como es el caso de los CRPs (*collagen-related piptides*), péptidos sintéticos que imitan la estructura de triple hélice de colágeno y que están constituidos por un motivo de repetición GPO. Estos péptidos mimetizan la activación plaquetaria inducida por colágeno, e inducen la agregación de manera independiente de α2β1.[144,145] Existe además un gran número de lectinas tipo C (venenos de serpiente) capaces de activar GPVI. La primera descubierta y de uso más extendido es la convulxina, que se extrae del veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus Durissus terrificus,* y activa selectivamente a este receptor.[146,147] La convulxina es una toxina multimérica con gran capacidad de clusterizar el receptor e inducir así la activación plaquetaria.[148,149] Cabe destacar que, a diferencia del colágeno que activa otros receptores presentes en las plaquetas, el CRP y la convulxina son activadores específicos de GPVI, por lo que tienen gran interés para el estudio específico de la vía de señalización de este receptor. Por último, existen anticuerpos monoclonales como JAQ1 que pueden inducir la activación específica de GPVI.[133]

Los eventos de fosforilación originados por CRP, convulxina, y anticuerpos anti GPVI son cualitativamente similares a las inducidas por colágeno, aunque la intensidad de la respuesta es considerablemente mayor en los primeros. Los estímulos específicos de GPVI tienen la capacidad de inducir la formación de grupos de GPVI en la superficie de las plaquetas, generando así una señal intracelular de gran alcance, mientras que los motivos GPO del colágeno no presentan la espaciación adecuada para inducir un grado equivalente de agrupación.

1.2.3 Vía de señalización de GPVI

El receptor GPVI se encuentra constitutivamente asociado con FcRγ formando el complejo GPVI/FcRγ en la membrana de las plaquetas. La fosforilación en tirosina (pTyr) del dominio ITAM de la cadena FcRγ resulta esencial para la activación de GPVI[136,150] y es llevada a cabo por proteínas de la familia de las Src quinasas como Fyn y Lyn. Esta fosforilación tiene lugar en las balsas lipídicas de las membranas a las que se trasloca GPVI durante su activación.[151,152] La fosforilación del motivo ITAM desencadena una cascada de señalización que se inicia con la fosforilación de la tirosina quinasa Syk, quien a su vez fosforila varios residuos tirosina de la proteína adaptadora LAT. La activación de LAT conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen el dominio SH2 (Grb2 y Gads) y también de PLCγ2 hacia las balsas lipídicas. Gads, por su parte, se asocia constitutivamente con SLP-76 y ambas proteínas son reclutadas por la fosforilación de LAT. La activación de PLCγ2 desencadena un aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático y la consiguiente liberación del contenido de los gránulos plaquetarios al plasma, los cuales actúan como factores de refuerzo positivo. En la Figura 6 se muestra un esquema de la vía de señalización desencadenada tras la activación de GPVI.

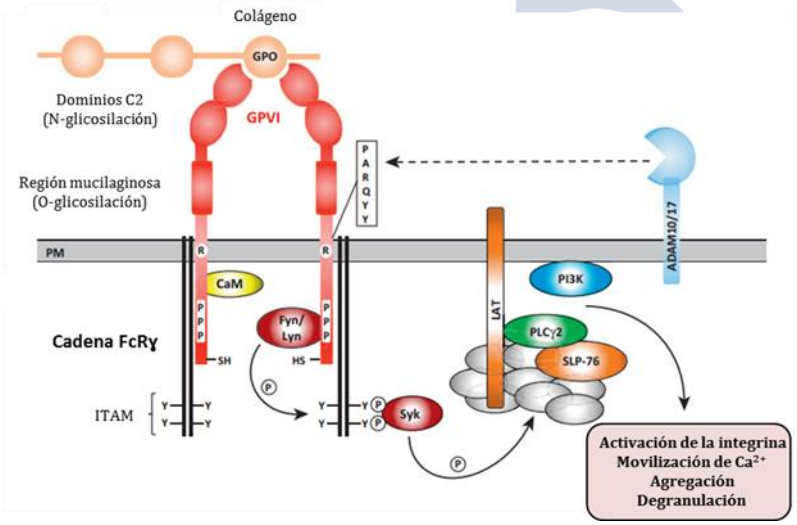


Figura 6. Vía de señalización de la glicoproteína VI (GPVI). *Ilustración adaptada de Sebastian Dütting et al.*[137]

La activación mediada por GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas al endotelio y promueve la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias que hacen que el trombo crezca y se consolide. Tras la activación, la expresión de fosfatidilserina (PS) proporciona actividad protrombinasa aumentando la formación de trombina. Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el lugar de la lesión vascular, y liberarán microvesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica. Muchas otras

proteínas efectoras forman parte de esta vía, la cual comparte muchas similitudes con otros receptores, como el receptor de células T. Se ha demostrado que algunas de las proteínas de esta vía son esenciales, como es el caso de FcRγ y Syk, ya que las plaquetas de ratones *knock-out* para estas proteínas no son reactivas frente a CRP y colágeno.[153]

La expresión de GPVI en la superficie plaquetaria es estrictamente dependiente de su asociación con FcRγ. Estudios de asociación virtual,[154] así como de cristalografía[135,155] han demostrado que el GPVI/FcRγ en estado monomérico no tiene afinidad por el colágeno, mientras que la forma dimérica presenta elevada afinidad. Se sabe que existe una subpoblación de GPVI que forma dímeros de manera constitutiva en la superficie de las plaquetas, lo que facilita una rápida clusterización del receptor tras su activación.[156] Por otro lado, hay evidencias claras de que la mayoría de las moléculas de GPVI existen en forma monomérica en las plaquetas inactivas, y que la activación plaquetaria con agonistas solubles induce la dimerización del receptor promoviendo de este modo su activación por colágeno.[157,158]

Resulta interesante destacar que las propias plaquetas cuentan con mecanismos inhibitorios de la señalización de GPVI. Por un lado, la señalización basal de GPVI está bloqueada por su proximidad a receptores como PECAM-1, CECAM1 y G6b, que contienen motivos de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, ITIM). Estos receptores actúan como reguladores negativos de la señalización plaquetaria mediada por GPVI.[142] Por otro lado, el receptor GPVI presenta un lugar de corte reconocido por metaloproteasas que sirve para regular a la baja la reactividad de las plaquetas. Este lugar de corte se localiza en el dominio extracelular muy cerca de la membrana, y su escisión da lugar a un fragmento de GPVI soluble (GPVIs) de 55 kDa y un fragmento transmembrana de 10 kDa.[159]

1.2.4 Papel de GPVI en trombosis y hemostasia

Varios estudios destacan el papel crucial que desempeña GPVI en la trombosis arterial *in vivo,*[160-162] y han demostrado que GPVI se une a las estructuras de colágeno presentes en la región central de la placa ateromatosa humana.[163] La inhibición de este receptor da lugar a protección contra la aterosclerosis en conejos y ratones[164] y también contra la formación de trombos arteriales.[165-167] De este modo, se sabe que a pesar de su papel esencial en el proceso de trombosis arterial, GPVI parece ser de menor importancia para la hemostasia normal, ya que su deficiencia no se asocia con mayor riesgo de hemorragia en humanos ni

en ratones.[165] Todo ello, junto con el hecho de que GPVI se expresa solamente en las plaquetas y megacariocitos, ha hecho de este receptor una diana farmacológica antitrombótica prometedora para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, proporcionando una buena relación riesgo/beneficio.[168]

El grupo de Boris Bigalke ha sido pionero en el estudio de GPVI en pacientes con SCAs y han hecho numerosos e importantes avances en este campo. Inicialmente han demostrado en varios estudios y utilizando un elevadísimo número de pacientes, que la expresión de GPVI está aumentada en la superficie de las plaquetas de pacientes con SCA,[169-172] lo que asociado al bajo recuento de plaquetas en estos pacientes refleja una mayor activación y reclutamiento de plaquetas al lugar de la lesión.[171] Más en concreto, han demostrado que el aumento de GPVI en la superficie de plaquetas de pacientes con IAM se correlaciona con una disminución de GPVI soluble, y afirman que estas medidas tienen una mejor asociación con el desarrollo de la enfermedad en etapas iniciales del proceso que la propia troponina I utilizada como marcador de daño miocárdico.[173] Por otro lado, el aumento de GPVI en superficie se asocia con una mayor agregación residual, aun a pesar de los tratamientos antiplaquetarios.[170] Además proponen a GPVI soluble como una molécula interesante para estudios de imagen molecular que podría identificar placas vulnerables a la ruptura[174] y destacan su gran valor predictivo y pronóstico para la estratificación de los pacientes con SCAs. En resumen, Bigalke y colaboradores proponen firmemente al receptor GPVI como un biomarcador útil para detección temprana de isquemia miocárdica, que contribuye además a la estratificación de pacientes de riesgo y predice su evolución clínica. En relación a lo dicho, nuestro grupo ha estudiado recientemente el proteoma de plaquetas de pacientes con IAMCEST y los resultados sugieren una participación directa de la vía de GPVI en el evento agudo.[175] Este resultado, junto con los estudios de Bigalke, ha dirigido nuestros esfuerzos al estudio en profundidad de este receptor y de su vía de activación, siendo uno de los temas principales de esta tesis doctoral.

1.2.5 Inhibición de la activación de GPVI

Como ya se ha comentado, el desarrollo de fármacos contra la activación de GPVI tiene un gran interés antitrombótico y antiinflamatorio. Han sido muchos los esfuerzos focalizados en el desarrollo de diferentes estrategias para inhibir la activación plaquetaria desencadenada por GPVI, pero por el momento no existe ningún fármaco disponible en la clínica. Entre estas estrategias se encuentra el uso de compuestos que se unen a GPVI (anticuerpos, aptámeros y pequeñas moléculas), la inhibición competitiva por colágeno

(imitadores de GPVI), la depleción de GPVI, la inhibición de mediadores de la vía de GPVI y la inhibición de la dimerización/oligomerización del receptor.

- **Bloqueo del receptor GPVI**

El bloqueo directo del lugar de unión a colágeno del receptor GPVI, podría ser una estrategia prometedora para prevenir la formación de trombos oclusivos en vasos enfermos, con poco o ningún aumento en el riesgo de sangrado.

En este contexto se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra GPVI mediante inmunización de ratones *knockout* para GPVI, utilizando células CHO que expresan cantidades altas de GPVI humano.[176] Estos anticuerpos reciben el nombre de OM2 y OM4, y sus fragmentos Fab han resultado ser eficaces en la inhibición de la trombosis sin alterar la expresión del receptor ex vivo en ratas y monos cynomolgus, sin causar un aumento significativo del riesgo de sangrado.[177-179] Se ha demostrado también que estos fragmentos inhiben la formación de trombos oclusivos *in vivo* en arterias lesionadas de ratas y ratones.[161,178] El fragmento Fab de OM2 se ha utilizado en esta tesis doctoral.

Los aptámeros, también denominados anticuerpos químicos, son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ARNss) y ARNs aislados de genotecas de oligonucleótidos por selección *in vitro* mediante enriquecimiento exponencial en presencia del ligando (*systematic evolution of ligands by experimental enrichment*, SELEX). El descubrimiento de aptámeros útiles para la inhibición de GPVI fue llevado a cabo por el grupo de Christopher Rusconi en el año 2010. Lo más interesante es que esta inhibición puede ser revertida a demanda, ya que los aptámeros presentan un lugar de unión para un agente control que lo inactiva, volviendo la función del receptor a la normalidad. De este modo, Rusconi propone un antagonista de GPVI activamente controlable con interés farmacológico.[180]

- **Inhibición competitiva por colágeno**

Otra estrategia para inhibir la activación de GPVI se basa en la inhibición competitiva por el colágeno utilizando compuestos que presentan una mayor afinidad por él que el propio GPVI.

Con este fin, se ha sintetizado una proteína formada por la forma soluble y dimérica de GPVI fusionada con el fragmento Fc de la IgG humana (GPVI-Fc). Esta inmunoadhesina soluble denominada Revacept, inhibe la adhesión plaquetaria estable y la agregación en vasos lesionados de ratones, disminuyendo la trombosis arterial,[181] preserva la función miocárdica tras una isquemia transitoria,[182] y mejora la disfunción vascular en la aterosclerosis sin ningún impacto sobre los tiempos de sangrado.[183] Un estudio clínico en

fase I demostró que el tratamiento de pacientes con Revacept inhibe eficazmente la agregación plaquetaria inducida por colágeno de forma dosis-dependiente y que no tiene efectos en la hemostasia ni en la coagulación plaquetaria.[184] Las limitaciones potenciales para el uso de Revacept son la evaluación de la cantidad de colágeno expuesto en las lesiones arteriales, y por lo tanto la cantidad de producto a inyectar, y el riesgo de la inmunización resultante de neoepítopos expuestos por la proteína de fusión.

- **Inmunodeplección de GPVI**

La eliminación del receptor GPIV de la superficie de las plaquetas circulantes es otra estrategia interesante. Existen dos vías principales por las que las plaquetas pueden regular a la baja la expresión d GPVI en superficie, bien por internalización y degradación del receptor, o bien por desprendimiento del ectodominio, siendo esta última estrategia la predominante en condiciones normales *in vivo.*[185] La depleción de GPVI es específica e irreversible y se realiza mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Un ejemplo es el caso de los anticuerpos de la familia JAQ, cuya inyección en ratones produce una deficiencia del receptor similar a la observada en pacientes que habían desarrollado autoanticuerpos contra GPVI, pero acompañada de una trombocitopenia transitoria. Además, los ratones mostraban un fenotipo similar al de los ratones *knockout* que se prolongó durante varios días ya que el anticuerpo era capaz de penetrar en la médula ósea afectando a los megacariocitos.[165] De este modo, se sabe que los ratones con GPVI depleccionado presentan protección antitrombótica en diferentes modelos de trombosis arterial pero con un aumento moderado del riesgo de sangrado.

- **Inhibición de mediadores de la vía de GPVI**

Otro enfoque posible para amortiguar la actividad de GPVI podría tener como objetivo otras proteínas de la vía. Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento de ratones con un inhibidor específico Syk (PRT318) disminuye considerablemente la trombocitopenia y la trombosis inducidas por heparina en ratones transgénicos.[186] El inconveniente de esta estrategia es que Syk juega un papel crucial en la señalización de otros tipos celulares como células B, neutrófilos y macrófagos. Cabe mencionar que ya existen en la clínica inhibidores de Syk de administración oral, utilizados para el tratamiento del linfoma de células B y la leucemia.[187] Su uso potencial como terapia antitrombótica debe ser evaluado a fondo y aportar beneficios antitrombóticos que superen sus efectos indeseados sobre el sistema inmune.

- **Inhibición de la dimerización/oligomerización de GPVI**

La inhibición de la dimerización u oligomerización de GPVI también ha llamado la atención por su potencial interés terapéutico. Un ejemplo sería la utilización de los agentes que incrementan los niveles de AMPc, pero su efecto es inespecífico ya que el AMPc tiene un efecto inhibidor global sobre las plaquetas. Otro ejemplo es el losartán, un antagonista de los receptores de angiotensina II, que inicialmente se había propuesto como inhibidor de la activación de plaquetas inducida por colágeno *in vitro*. Un análisis estructural mostró una interacción hidrófoba entre losartán y el dominio D1 de GPVI.[188,189] Un estudio reciente ha demostrado que el mecanismo de actuación de losartán sobre GPVI es la inhibición de su clusterización, sin embargo el tratamiento de pacientes con una dosis terapéutica del fármaco no alcanza la eficacia antiagregante observada *in vitro.*[190]

- **Mecanismos alternativos**

Las histona deacetilasas (HDAC) son un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos lisina de las histonas. Los inhibidores de estas enzimas (HDACi) poseen una larga historia como fármacos utilizados en psiquiatría, neurología y cáncer. Estos inhibidores también tienen efectos en proteínas no histonas alterando el grado de acetilación e incrementando o reprimiendo así su actividad. Los HDACis inducen trombocitopenia debido a la reducción del número de los precursores plaquetarios en los megacariocitos, sin causar apoptosis en las plaquetas y sin interferir en su tiempo de vida media. No se conoce bien el mecanismo de actuación pero se cree que está relacionado con el aumento de la acetilación de GPVI en los megacariocitos, con el consiguiente resultado de una menor expresión de GPVI en las plaquetas. Los HDACi inhiben específicamente la activación de GPVI mediada por CRP en ratones, reducen la expresión de GPVI en plaquetas de ratones, inhiben la vía de señalización de GPVI en plaquetas de ratones y aumentan los niveles de GPVI acetilado.[191]

En resumen, los datos disponibles sugieren que GPVI posee varias propiedades que lo convierten en un diana farmacológica prometedora para el tratamiento eficaz y seguro de enfermedades trombóticas e inflamatorias. En primer lugar, GPVI es únicamente expresado en megacariocitos y plaquetas lo que minimiza el riesgo de efectos no deseados de los fármacos en otros tipos celulares. Además el bloqueo podría ser fácilmente dirigido contra GPVI por inmunodepleción, lo que resultaría en un una regulación a largo plazo en los receptores en las plaquetas circulantes. Por otro lado parece ser que la deficiencia de GPVI y su inhibición experimental disminuyen claramente la formación de trombos en diferentes

lechos vasculares sin ejercer fuertes efectos hemostáticos. En línea con esto, se especuló que otros receptores podrían compensar la función GPVI defectuosa en la prevención de la pérdida de sangre,[192] lo que explicaría las tendencias de hemorragias leves observadas en humanos y ratones que carecen de GPVI. Por todo ello, GPVI ha sido postulado como una de las dianas más atractivas para el desarrollo de fármacos con potencial antitrombótico ya que su inhibición parece combinar de forma ideal eficacia y seguridad.[193]

Es importante señalar que, aunque los modelos animales han sido fundamentales para la comprensión de la función y de la relevancia fisiopatológica de GPVI, la extrapolación a humanos no siempre ha mostrado los mismos resultados. En este contexto, el modelo de ratón humanizado GPVI recientemente descrito representa una herramienta interesante para la evaluación de compuestos anti-GPVI *in vivo*, así como para evaluar el papel de del receptor en distintos modelos de trombosis.[194]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 Proteómica

1.3.1 Introducción a la proteómica

La proteómica es una disciplina joven y en pleno desarrollo encargada de estudiar el conjunto de proteínas que integran un sistema biológico en un momento determinado, es decir, su proteoma. Que la definición anterior incluya la expresión "un momento determinado" no es arbitrario, ya que una característica fundamental de un proteoma es su dinamismo. Cuando estudiamos el proteoma de una determinada situación fisiológica o patológica obtenemos una imagen estática del mismo, pero esta aparente simplicidad se disipa cuando tratamos de comprender las funciones que desempeñan las proteínas, su estructura, sus relaciones e interacciones, sus modificaciones y sus isoformas. Esto es lo que se conoce como postgenómica o proteómica de segunda generación.

No es fácil enmarcar el origen de la proteómica en un momento determinado a pesar de que el término "proteoma" aparece por primera vez en 1944.[195] Hoy en día la proteómica se ha consolidado como uno de los conjuntos de herramientas más empleados en investigación gracias a los numerosos avances y mejoras de las técnicas convencionales, y al desarrollo de nuevas técnicas y bases de datos. En las etapas iniciales, los estudios proteómicos consistían en la generación de simples mapas proteicos mediante electroforesis bidimensional (*two-dimensionl electrophoresis*, 2-DE), pero el verdadero avance, la identificación de las proteínas, solo fue posible a partir de los años 90 gracias el desarrollo de la espectrometría de masas y la disponibilidad de la secuencia del código genético humano.[196,197]

El nacimiento del proyecto proteoma humano (PPH) en 2001 supuso una gran revolución en el mundo de la proteómica. Este proyecto nace con los objetivos principales de crear un mapa de proteínas humanas en su contexto biológico, proporcionar herramientas que ayuden a diseñar experimentos e inspirar a la comunidad científica, y el desarrollo de métodos de diagnóstico, prevención y tratamiento útiles para la curación de enfermedades y mejora de la salud humana. En el año 2014 se publicó el primer borrador del proteoma humano que incluye la identificación de proteínas codificadas por aproximadamente el 84% de los genes que se conoce que codifican proteínas en humanos, y además regiones codificantes de proteínas novedosas.[198] Este gran catálogo del proteoma humano (disponible en la web interactiva http://www.humanproteomemap.org) complementará

los datos del genoma y transcriptoma humanos disponibles para acelerar y facilitar la investigación biomédica en condiciones fisiológicas y patológicas.

Las principales áreas de estudio de la proteómica son la identificación de proteínas, la caracterización y análisis de PTMs que sufren las proteínas, el estudio de las interacciones proteína-proteína, el estudio de la expresión diferencial entre dos condiciones a comparar, así como la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y la validación de las mismas.

Aunque el conocimiento del genoma y proteoma completos de un organismo nos da una idea de la complejidad del mismo, es el conjunto completo de interacciones entre todas las moléculas que lo conforman lo que realmente determina su función. Comprender la complejísima interacción existente entre el genoma, el proteoma, el transcriptoma, el metaboloma, el glicoma, el lipidoma, etc. de un determinado sistema biológico, es la única posibilidad de conocer en profundidad cómo funciona. El conjunto completo de interacciones entre las moléculas que constituyen un sistema biológico se conoce como interactoma.[199] Las disciplinas anteriormente mencionadas confluyen con la bioinformática, la bioestadística y otras ciencias, originando lo que se conoce actualmente como biología de sistemas (Figura 7).[200] De este modo, la biología de sistemas propone una visión holística de un organismo ya que se trata de un estudio interdisciplinario cuya pretensión es estudiar todas las interacciones entre los componentes de un sistema biológico para comprender profundamente su funcionamiento, además de poder predecir su comportamiento en respuesta a cambios en el entorno.

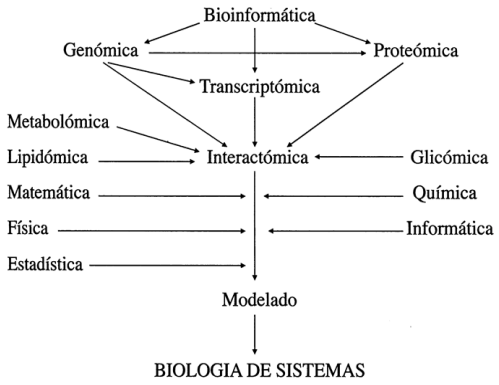


Figura 7. Disciplinas científicas que convergen para la formación de la biología de sistemas*. Ilustración del Manual de proteómica de la Sociedad Española de Proteómica.*[201]

1.3.2 Diseño experimental en estudios cardiovasculares de proteómica de plaquetas

A la hora de diseñar un experimento en el campo de la proteómica resulta necesario plantearse bien el tipo de estudio que se va a realizar, el tipo de proteínas que se quieren estudiar y la cantidad de recursos de los que se dispone. En un estudio clínico de proteómica de plaquetas existen numerosos pasos que van desde la selección de los pacientes, la extracción de la sangre y el aislamiento de las plaquetas, a la obtención del proteoma y análisis del mismo (Figura 8). Todas las etapas deben estar bien definidas y cumplir con estrictos controles de calidad, con el fin de minimizar la variabilidad técnica. Todos los criterios necesarios para realizar un buen estudio clínico de proteómica de plaquetas han sido recopilados y descritos en profundidad en una revisión recientemente publicada por nuestro grupo.[51]

Al trabajar con muestras de pacientes, la aprobación del estudio por parte de los comités de ética clínica es un paso ineludible, pero además es importante tener en cuenta la limitada cantidad de muestra disponible por paciente. La selección de pacientes y donantes, así como la correcta estratificación de los grupos que se van a estudiar, resulta crucial. Es importante prestar especial atención a los tratamientos que presentan los pacientes/donantes ya que pueden tener importantes efectos es en la función plaquetaria,[202] en especial los fármacos antiplaquetarios, antiinflamatorios y antidepresivos que pueden alterar la activación y la agregación de las plaquetas.[203] El estado físico y el estrés también pueden influir en la reactividad plaquetaria por lo que es aconsejable extraer la sangre siempre a la misma hora ya que los ritmos circadianos afectan a la agregabilidad y adhesividad de las plaquetas.[204] Los parámetros clínicos y de laboratorio también deben ser analizados a la hora de seleccionar pacientes y establecer grupos de estudio para así evitar poblaciones mixtas que pudiesen causar confusión o interpretaciones erróneas de los resultados.

Al trabajar con plaquetas, es importante tener en cuenta su naturaleza hipersensible ya que cambios mínimos en el momento de la recogida de sangre y preparación de la muestra pueden activarlas o deteriorarlas. Por ello es de gran importancia la toma de todas las precauciones necesarias durante la recogida de muestras para los estudios plaquetarios, especialmente en el caso de estudios de búsqueda de biomarcadores clínicos. Recientemente Everts y colaboradores han publicado una revisión recopilando estudios relacionados con la manipulación adecuada de las muestras en estudios plaquetarios con el fin de evitar su activación.[205] Las muestras deben ser extraídas siempre con el individuo en estado de reposo y siempre de la misma fuente, es decir, sangre arterial o sangre venosa. Zellner y Oehler publicaron recientemente los parámetros recomendados para la extracción

de sangre destinada a estudios plaquetarios, aconsejando extraer la sangre de la vena cubital, desechar los primeros 2 mL de sangre, utilizar una aguja de 21g y un torniquete, y recoger las muestras en tubos con anticoagulantes que preserven la activación plaquetaria.[206] Los tubos seleccionados para la extracción de muestras pueden influir en las funciones plaquetarias y en los estudios proteómicos posteriores, por lo que se recomienda que sean de plástico y contengan como anticoagulante un 3,8% de citrato sódico. El procesamiento de la muestra debe hacerse tan pronto como sea posible, y siempre antes de que transcurran 2 h tras la extracción de la sangre. Las condiciones ambientales también deben ser adecuadas dado que las plaquetas son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura y pH por lo que debemos tenerlos en cuenta durante el transporte y manipulación de las muestras. La temperatura debe estar entre 20-25°C y el pH debe ser controlado en torno a 6,6 con ácido-citrato-dextrosa (ACD) con el fin de evitar la agregación.

Durante el aislamiento de las plaquetas es crucial evitar la contaminación con otras células o proteínas plasmáticas para un análisis exitoso del proteoma. En cuanto a la separación de las plaquetas de otros tipos celulares no existe un método estandarizado. Algunos estudios utilizan centrifugación cuidadosa de la sangre para obtener el plasma rico en plaquetas (*platelet-rich plasma*, PRP), mientras que otros utilizan filtros para eliminación de leucocitos.[207-209] Recientemente se ha desarrollado una estrategia alternativa basada citometría de flujo utilizando bolas magnéticas contra la subunidad β3 de la integrina.[210] La separación de plaquetas y plasma, se puede realizar por filtración en gel o por centrifugaciones sucesivas realizadas en presencia de inhibidores que eviten la activación de las plaquetas. Esta última alternativa es la utilizada con éxito por nuestro grupo[211] y será explicada en profundidad en la sección de material y métodos. Por último, es aconsejable volver a suspender las plaquetas en un tampón fisiológico adecuado, como puede ser el tampón de Tyrode modificado (*modified Tyrode´s buffer*, MTB). Se recomienda realizar una etapa de centrifugación final para reducir las proteínas plasmáticas al mínimo y obtener plaquetas lavadas. Todos los pasos de centrifugación deben ser realizados a temperatura ambiente ya que la refrigeración puede activar las plaquetas.[212] El recuento de las plaquetas puede hacerse idealmente utilizando un analizador electrónico de partículas, por ejemplo un contador de partículas Coulter, para finalmente resuspenderlas a la concentración deseada con un tampón adecuado, que de nuevo puede ser tampón de Tyrode modificado. Es importante tener en cuenta que la concentración de las plaquetas tras su aislamiento nunca debe exceder las 10^9 plaquetas/mL para evitar su activación espontánea.

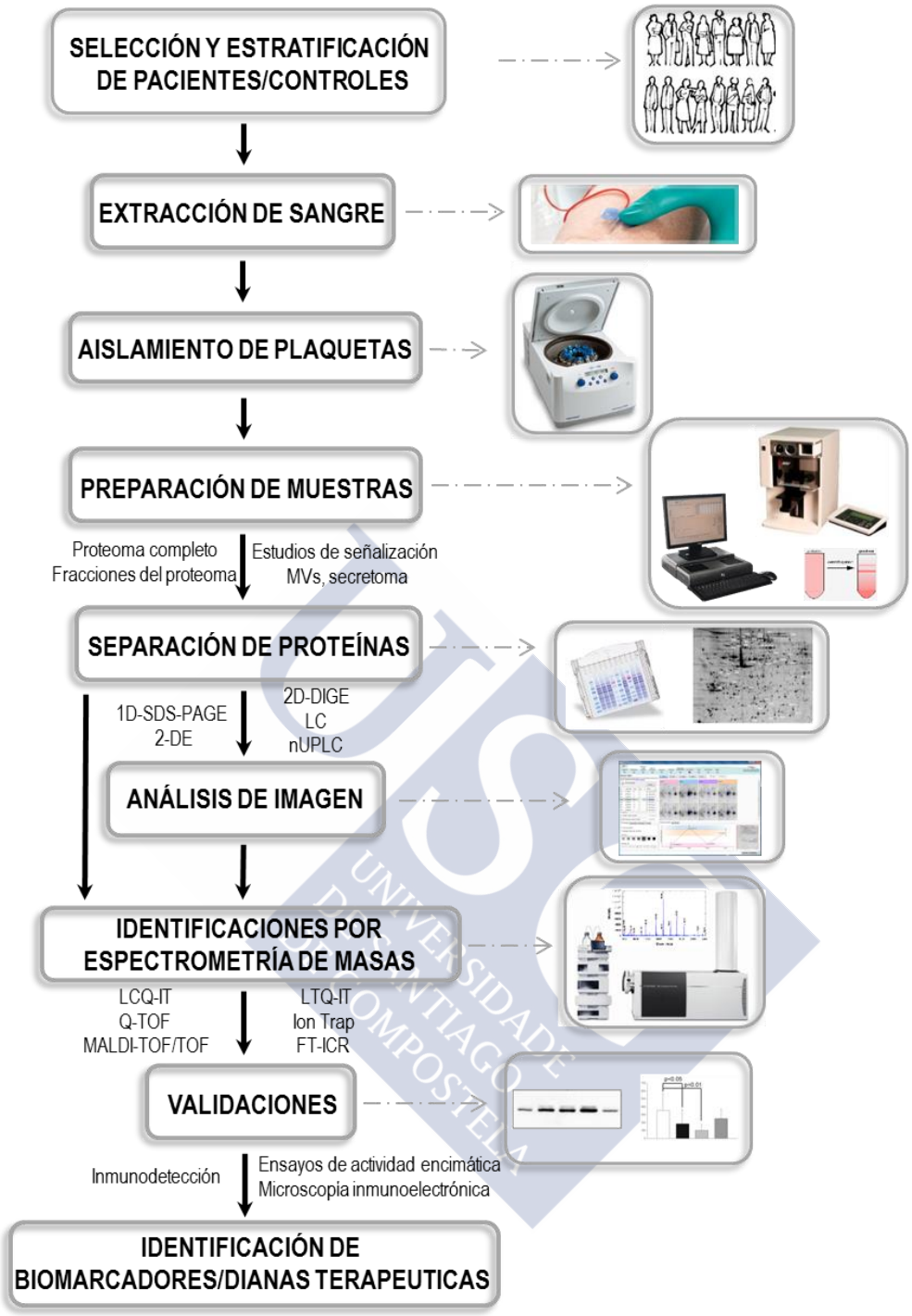


Figura 8. Flujo de trabajo esquemático para estudios de proteómica de plaquetas en enfermedades cardiovasculares. *Ilustración adaptada de Vélez et al.*[51]

Las técnicas más utilizadas en proteómica se basan en la electroforesis, como método preparativo, y en la espectrometría de masas, como método analítico. Sin embargo la proteómica de nueva generación denominada proteómica de perdigones (o *shotgun proteomics)* utiliza técnicas proteómicas no basadas en gel que están tomando el relevo por su gran sensibilidad y sus numerosas aplicaciones.

1.3.3 Técnicas de separación de proteínas

Debido a la enorme complejidad que supone el estudio de un proteoma se hace indispensable una separación bioquímica de la muestra. Con este fin se utilizan diversas técnicas entre las que destacan la electroforesis monodimensional (*one-dimensional electrophoresis*, 1-DE), la electroforesis bidimensional (*two-dimensional electrophoresis*, 2-DE) y la cromatografía líquida (*liquid chromatography*, LC).

La técnica electroforética más empleada es la 1-DE en geles de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) y se basa en la separación de las proteínas en función de su masa molecular relativa (Mr). Esta técnica requiere de la adición del detergente dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) con el fin de desnaturalizar las proteínas y asegurar que todas ellas se encuentren cargadas. En la electroforesis 2-DE, el fraccionamiento por Mr es precedido por una separación basada en el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, lo que aumenta mucho la resolución del análisis. Esta técnica presenta algunos inconvenientes como son la baja representación de proteínas muy hidrofóbicas, de proteínas extremadamente acidas o básicas, y de proteínas de muy alto peso molecular. Una vez realizado el fraccionamiento, la tinción de los geles permite visualizar las proteínas separadas.
Una variante de la 2-DE convencional es la electroforesis bidimensional diferencial en gel (*two-dimensional differential gel electrophoresis*, 2D-DIGE) que disminuye la variabilidad técnica y mejora la reproducibilidad. Otra ventaja importante del 2D-DIGE es la considerable reducción en la cantidad de muestra requerida para el análisis. Esta técnica será explicada en profundidad a continuación ya que es la base de algunos de los estudios que componen esta tesis.

1.3.3.1 La electroforesis bidimensional diferencial en gel, 2D-DIGE

La electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) es una variación de la electroforesis bidimensional clásica diseñada para mejorar algunas de sus limitaciones más importantes. Esta técnica permite la cuantificación precisa de cambios en el proteoma, incluyendo isoformas y modificaciones postraduccionales.[213] En los estudios 2D-DIGE, las proteínas de hasta tres muestras distintas son marcadas con fluoróforos espectralmente distinguibles, mezcladas y separadas en un único gel. Generalmente, una de las tres muestras en un estándar interno, es decir una mezcla a partes iguales de las otras dos muestras a comparar.[214] El estándar interno ayuda a normalizar las posibles diferencias técnicas producidas por la manipulación de las muestras[215] de modo que se reduce la

variabilidad entre geles y se mejora la reproducibilidad y la capacidad de extraer información cuantitativa de los análisis. Todas las manchas proteicas pueden ser medidas en base a la relación que presenten respecto a su mancha correspondiente presente en el estándar interno.[214] Este sistema permite separar y comparar la expresión de proteínas de varias muestras para detectar variaciones en el nivel de expresión de cada una de ellas en las diferentes condiciones, y permite además separar la variabilidad técnica de la variación biológica inherente a las propias muestras.[216] El esquema simplificado del funcionamiento de esta técnica se puede consultar en la Figura 9.

- **Preparación de la muestra para estudios 2D-DIGE**

La preparación de la muestra es uno de los pasos más importantes en proteómica ya que de ello depende la calidad, la relevancia y la fiabilidad de los datos obtenidos.[217] De este modo resulta fundamental que el procesado no altere de modo alguno la muestra.

Así, para realizar un análisis por electroforesis bidimensional 2D-DIGE es necesario que las proteínas se encuentren desnaturalizadas, disgregadas, reducidas y solubilizadas. Para ello existen numerosos protocolos dependiendo del tipo de muestra, y del grupo de proteínas que se va a estudiar, aunque estos protocolos deben ser revisados, ajustados y optimizados en función de las características de cada estudio.[218]

- **Fundamento y desarrollo de la técnica 2D-DIGE**

Para que varias muestras puedan ser resueltas en un mismo gel, se recurre su marcaje con diferentes fluoróforos denominados CyDyes (Cy2, Cy3 y Cy5) antes de realizar la electroforesis. Estos fluoróforos son cianinas que se excitan y emiten a longitudes de onda diferentes y conocidas, lo que permite su detección de manera independiente utilizando diferentes filtros y láseres en un escáner. Su unión a las proteínas es lineal y tienen una masa molecular similar entre sí. Existen dos versiones diferentes de fluoróforos: los utilizados para el marcaje mínimo (*minimal dyes*) que se unen a residuos lisina de las proteínas y los utilizados en el marcaje de saturación (*saturation dyes*) que se unen a residuos cisteína. El marcaje mínimo es el más utilizado cuando se dispone de la cantidad de muestra necesaria ya que funciona uniéndose a residuos más accesibles y frecuentes en las proteínas, además de presentar la gran ventaja de ser mucho más económico. Las diferencias entre ambos marcajes se muestran en la Tabla 2. En esta tesis se han empleado los fluoróforos de marcaje mínimo.

Tabla 2. Tipos de marcaje para 2D-DIGE: marcaje mínimo y marcaje de saturación.

	Marcaje mínimo	Marcaje de saturación
Residuos de unión	**1-2% de las lisinas**	**100% de las cisteínas**
Sensibilidad	**Alta (~1-2 ng)**	**Muy alta (~0,1 ng)**
Proteína necesaria por muestra	**~75 µg**	**~5 µg**

Del mismo modo que en una 2-DE convencional, el principio funcional del 2D-DIGE es la separación de las proteínas de una muestra mediante electroforesis en dos dimensiones: una primera dimensión en función de su carga eléctrica mediante isoelectroenfoque (*isoelectrofocusing*, IEF), y una segunda dimensión en función de su tamaño mediente SDS-PAGE. La adición de un paso extra entre ambas electroforesis resulta fundamental para preparar la muestra para la segunda dimensión. Este paso se conoce como equilibrado y se realiza incubando la muestra con tampones que contienen SDS, entre otros componentes. La incubación con SDS, confiere carga negativa a las proteínas asegurando que los péptidos tengan igual movilidad cuando se someten a un campo eléctrico y se separen únicamente por su tamaño. El equilibrado consta de dos fases: reducción y alquilación. La reducción es comúnmente realizada con de ditiotreitol (*dithiothreitol*, DTT) y sirve para mejorar la solubilidad de las proteínas al romper los puentes disulfuro que forman agregados, mientras que la alquilación suele realizarse con iodoacetamida (*iodoacetamide*, IAA) para proteger a los grupos sulfidrilo libres frente a la oxidación, evitando que se formen nuevos enlaces disulfuro.

- **Visualización y análisis de los mapas proteicos 2D-DIGE**

El siguiente paso es la digitalización de los geles. Para ello se utilizan escáneres potentes basados en láseres que permiten la exportación de imágenes a formatos informáticos adecuados para su posterior análisis con programas externos.[219,220] En el caso del 2D-DIGE, es necesaria la utilización de tres láseres y tres filtros diferentes para obtener cada una de las imágenes correspondientes a los diferentes Dyes, obteniendo así tres imágenes por cada gel.

Existen diferentes tipos de programas diseñados de forma específica para el análisis diferencial de las imágenes (Samespots, PDQuest, etc.). Estos programas utilizan algoritmos matemáticos complejos para poder detectar de manera fiel las manchas proteicas y normalizar las posibles diferencias de carga. Su misión es alinear los mapas de proteínas

obtenidos y emparejar las manchas entre geles para realizar un análisis estadístico apropiado que permita detectar diferencias significativas entre los grupos de imágenes a comparar.

SameSpots es uno de los programas más utilizados hoy en día para el análisis de imagen ya que es capaz de sobreponerse a los problemas más comunes del análisis de geles 2D, tales como la falta de reproducibilidad en los resultados, el prolongado tiempo de edición y la confianza en la significación estadística de la medición de los cambios de expresión de proteínas. Además es fácil de utilizar y contiene muchos procesos automatizados, proporcionando resultados rápidos, objetivos y reproducibles sobre la expresión diferencial de proteínas en geles bidimensionales. Su flujo de trabajo comienza con la creación de una imagen de fusión representativa de todos los geles incluidos en el análisis, para luego realizar el paso de detección de manchas proteicas. Los parámetros estadísticos son seleccionados por el usuario, quien puede determinar a qué nivel considera que la diferencia de expresión de una mancha determinada es real y con qué nivel de significación (p valor) la considera como tal. Este *software* de análisis de imagen ha sido el empleado en la presente tesis doctoral.

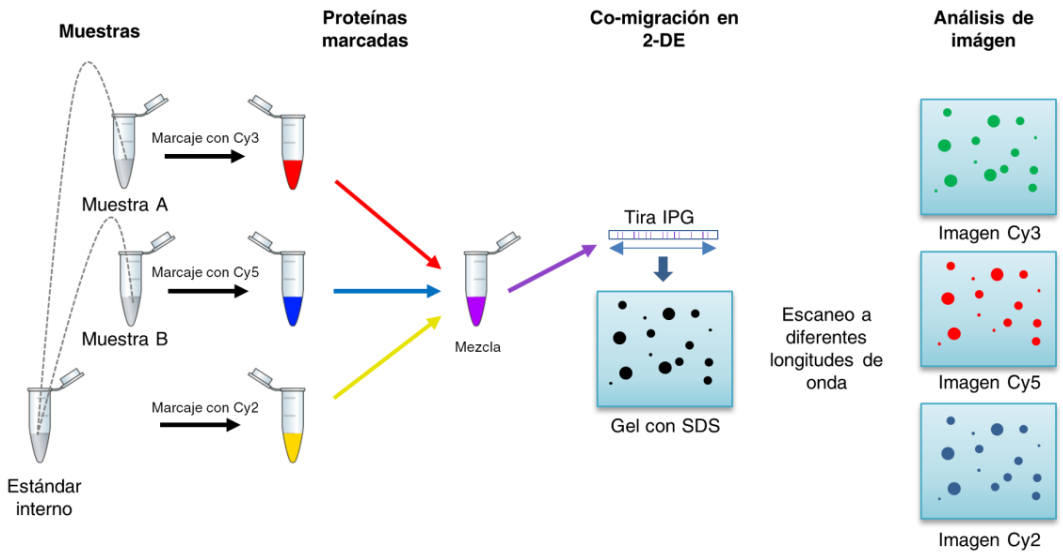


Figura 9. Representación esquemática de la técnica 2D-DIGE.

Aunque las técnicas más utilizadas en proteómica se basan en la electroforesis como método preparativo, han comenzado a desarrollarse técnicas y métodos alternativos para el estudio de proteínas a gran escala debido a los problemas tecnológicos de la electroforesis en gel, como la falta de resolución para el estudio de proteomas complejos. La cromatografía líquida es una de estas técnicas, y permite separar proteomas complejos en función de su hidrofobicidad (cromatografía de fase reversa), carga eléctrica (cromatografía de

intercambio catiónico/aniónico) o tamaño (cromatografía de exclusión molecular). Esta técnica en combinación con la espectrometría de masas en tándem y los algoritmos de búsqueda en base de datos de los que se hablará más adelante, son la base de la proteómica de nueva generación.[221]

1.3.4 Técnicas analíticas en proteómica: la espectrometría de masas

La espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) es una poderosa técnica analítica fundamental en proteómica que permite obtener información de la masa molecular del compuesto analizado así como información estructural del mismo, o simplemente detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. Esta técnica permite estudiar compuestos de naturaleza diversa (orgánica, inorgánica o biológica) o analitos, y lo hace en función de su relación masa/carga (m/z).

La gran revolución supuesta por la aparición de las técnicas de ionización suave en la década de los 80s, permitió la aplicación de la espectrometría de masas al estudio de proteínas de elevado peso molecular y al análisis de mezclas complejas, ya que los componentes de una mezcla se ionizan sin sufrir apenas fragmentaciones.[222] En las últimas décadas la combinación de los métodos de fragmentación suave y los analizadores de masas basados en tiempo de vuelo, han supuesto un enorme avance en el campo de la proteómica. La espectrometría de masas se ha convertido actualmente en una herramienta indispensable en cuanto a estudios proteómicos se refiere, y en el campo concreto de las plaquetas ha generado innumerables avances en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que subyacen a su comportamiento. En la actualidad, esta técnica continúa teniendo los mismos fundamentos que en su origen.

Los elementos principales que forman un espectrómetro de masas incluyen una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector que se mantienen en una cámara de vacío. Es necesario acoplar a estos elementos un procesador de datos para manejar toda la información obtenida. En la Figura 10 se esquematizan los componentes de un espectrómetro de masas.

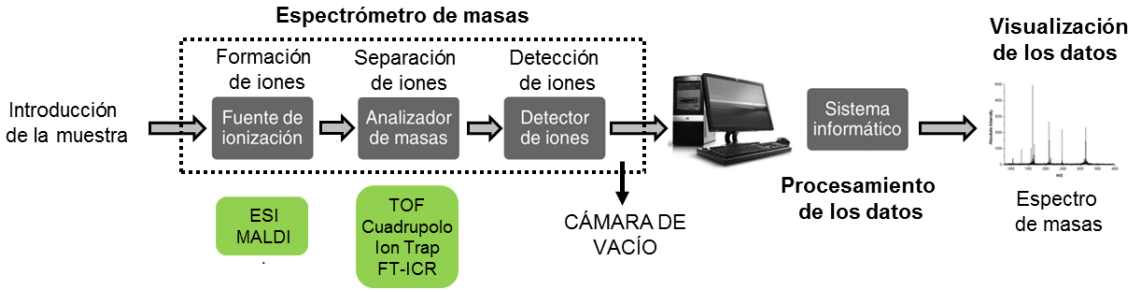


Figura 10. Elementos que conforman un espectrómetro de masas.

Fuente de ionización. Es la encargada de ionizar las moléculas, utilizando si fuera preciso una separación cromatográfica previa, para los iones en fase gaseosa. Los iones generados serán transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador. Las técnicas para la ionización determinan qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masas. Las fuentes más comúnmente utilizadas en proteómica son la ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI)[223,224] y la ionización/desorción inducida por láser asistida por matriz (*matrix-assisted lased desorption ionization*, MALDI).[225] Ambos tipos de fuentes se caracterizan por no producir una fragmentación excesiva de la muestra y se conocen como métodos de ionización suave.

Analizador de masas. Los iones generados en la fase anterior son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación m/z. Esta relación puede ser determinada mediante la aplicación de campos eléctricos o magnéticos, o en función del tiempo que tardan en llegar los iones al detector. Los analizadores afectan a la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas utilizando un campo eléctrico o magnético que provoca un cambio en la dirección de los iones que están volando a través del analizador. Los parámetros clave que caracterizan a un analizador son sensibilidad, resolución y precisión de masa. Existen cuatro tipos de analizadores utilizados comúnmente en proteómica: 1) los analizadores de tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF) que miden el tiempo que los iones tardan en llegar al detector; 2) los cuadrupolos (*quadrupole*, Q) basados en campos magnéticos; 3) los analizadores de trampa iónica (*ion trap*, IT) basados en la separación por eyección selectiva de iones por radiofrecuencia y campos eléctricos oscilantes y 4) los analizadores de transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) que se basan en la aplicación de un campo magnético muy intenso sobre la trayectoria de iones. En la Figura 11 se muestran los principales espectrómetros de masas utilizados en proteómica.

Las combinaciones más comunes de fuentes de ionización y analizadores utilizados en proteómica son MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF y ESI-Q-TOF.

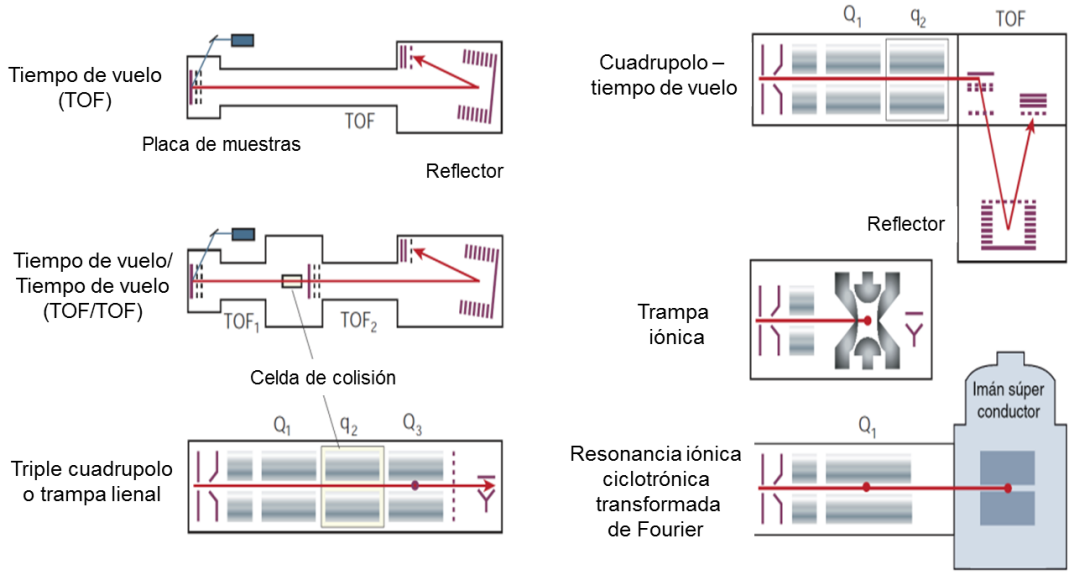


Figura 11. Tipos de espectrómetros de masas comúnmente utilizados en proteómica. *Ilustración adaptada de Aebersold et al.*[226]

Detector. Es el elemento del espectrómetro encargado de registrar la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie. La señal producida en el detector durante la trayectoria del ion, en función de su relación m/z, genera un espectro de masa. Así, la magnitud de la corriente producida en el detector en función del tiempo se utiliza para determinar la abundancia y el valor derivado de la relación m/z del ion. Hoy en día se utilizan principalmente los multiplicadores de electrones o placas de microcanales.

Procesadores de datos. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. Este ordenador se encarga de procesar los datos utilizando programas informáticos especializados[227] basados en algoritmos que correlacionan los datos obtenidos en el análisis de espectrometría de masas con las bases de datos disponibles, con el fin último de identificar la proteína.[228] El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación m/z de los iones detectados.

Las técnicas de identificación mediante espectrometría de masas son la identificación por huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF) y la espectrometría de masas en tándem o MS/MS.

La PMF es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada (generalmente tripsina), y este conjunto de péptidos es característico de cada proteína. Las masas absolutas de estos fragmentos pueden determinarse mediante la ionización MALDI o ESI acopladas a un analizador TOF. Las masas obtenidas son comparadas con una base de datos de proteínas cuya secuencia se conoce, o bien con una base de datos de información genómica mediante un enfoque *in sílico*, empleando softwares capaces de traducir las secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos.[229-233] La estrategia de PMF suele utilizarse para muestras poco complejas como las provenientes de manchas proteicas de geles 2D.[234] La puntuación de la proteína identificada se asigna mediante algoritmos que tienen en cuenta varios parámetros. Uno de los algoritmos más utilizados es MOWSE (*molecular weight search*)[230] que está incorporado en motores de búsqueda como el Mascot.[235]

La espectrometría de masas en tándem se utiliza para el análisis de proteínas complejas o conjuntos de proteínas, y se basa en el acoplamiento de una fragmentación adicional a una MS convencional (normalmente MALDI-TOF/TOF o nanoLC-ESI-MS/MS). En este proceso se acoplan dos analizadores de masas consecutivos que permiten seleccionar un péptido concreto de la muestra a estudiar y su fragmentación inducida por la colisión de los iones con un gas inerte. El segundo analizador del espectrofotómetro es quien se encarga de separar los fragmentos generados y crea un espectro de fragmentación MS/MS característico del péptido analizado que aporta además información sobre su secuencia de aminoácidos.[234] El espectro de masas obtenido se compara con la información almacenada en bases de datos de secuencias conocidas, como UniProt o GenBank, utilizando motores de búsqueda como Mascot (www.matrixscience.com) que ordenan las proteínas identificadas y llevan finalmente a la identificación de la proteína en cuestión.

1.4 Importancia de los estudios de proteómica de plaquetas

La ausencia de núcleo en las plaquetas, y en consecuencia su limitada capacidad de síntesis proteica, junto con la regulación de la actividad plaquetaria a nivel de PTMs, hacen de la proteómica una herramienta idónea para su estudio. A pesar de su idoneidad, la aplicación de la proteómica al estudio de las plaquetas es relativamente reciente. A finales de la década de los 90 la proteómica de plaquetas se inició con fuerza gracias principalmente al desarrollo de las técnicas e instrumentos necesarios, fundamentalmente la espectrometría de masas. Desde entonces numerosos grupos han centrado su investigación en este campo haciendo numerosos avances.

El estudio proteómico de las plaquetas aporta información tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Dependiendo del diseño del estudio, podemos obtener diferentes tipos de información. Las principales áreas de estudio en este campo son la identificación de proteínas y caracterización de sus PTMs, la proteómica de "expresión diferencial" (plaquetas basales/activadas, plaquetas de donantes/pacientes, plaquetas inhibidas farmacológicamente/no inhibidas, etc.), el estudio de las interacciones proteína-proteína y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Así, los estudios de proteómica de plaquetas pueden ayudar a identificar proteínas diana que se asocian con la génesis o progresión de una afección patológica, además de contribuir a revelar los mecanismos funcionales de las plaquetas. Este tipo de estudios prometen ampliar el conocimiento de los mecanismos que regulan las plaquetas en estado fisiológico y patológico, así como proporcionar biomarcadores potenciales y dianas terapéuticas para las enfermedades en las que las plaquetas desempeñan un papel relevante. Sin embargo estos estudios presentan algunas limitaciones, entre las que destaca su limitada capacidad para detectar proteínas muy poco abundantes. Con el fin de solventar esto, algunos investigadores han comenzado a realizar estudios de transcriptómica en plaquetas para predecir la expresión proteica a partir de sus precursores,[236,237] aunque es importante tener en cuenta que existe una asociación débil entre el transcriptoma y el proteoma de las plaquetas.[238]

En la Figura 12 se esquematizan las principales aplicaciones de los estudios de proteómica de plaquetas.

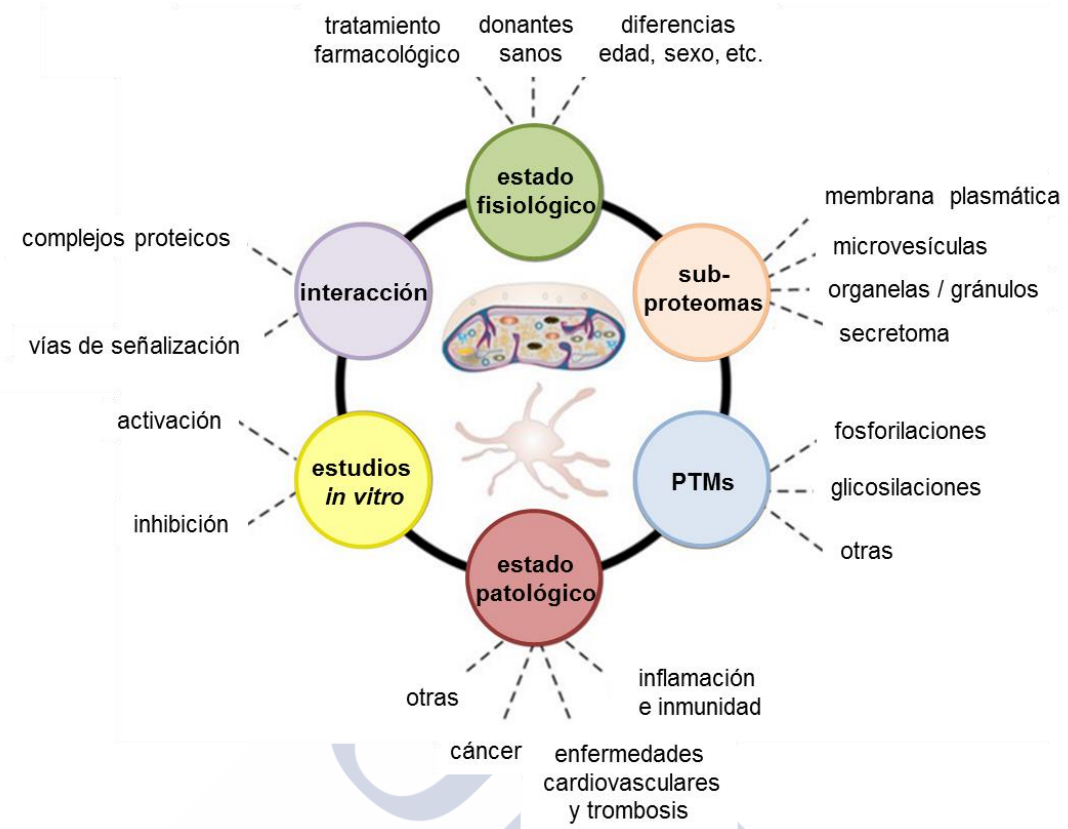


Figura 12. Aplicaciones actuales y futuras de la proteómica de plaquetas. *Ilustración adaptada de J. Burkhart y colaboradores.*[239]

Actualmente existen varias bases de datos de libre acceso en el campo de la proteómica de plaquetas que han sido revisadas por Senzel y colaboradores.[240] Entre ellas cabe destacar la de Dittrich y colaboradores, *PlateletWeb | Systems Biology Workbench,* que comprende una larga lista de proteínas provenientes de datos de varios estudios proteómicos a gran escala en combinación con proteínas anotadas en las bases de datos. Esta base de datos incluye además proteínas que se predice deberían estar en plaquetas basándose en la expresión de sus ARNm.[241] Una característica única de esta base de datos es que utiliza datos *in sílico* para proporcionar la primera visión global del interactoma, el fosfoprteoma y el kinoma plaquetarios. Esta base puede ser consultada en el siguiente enlace: http://plateletweb.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/plateletweb.php

Como ya se ha mencionado, la composición del proteoma plaquetario no es ni mucho menos estable y en ocasiones determinar la procedencia de las proteínas es todo un reto. Aunque las proteínas que conforman el proteoma de las plaquetas derivan principalmente de los megacariocitos, muchas otras son incorporadas desde el plasma en los gránulos alfa de las plaquetas o de los megacariocitos.[40,242] Además de esto, el proteoma plaquetario va

sufriendo alteraciones durante la vida de las plaquetas mediante la síntesis de proteínas,[243,244] la degradación proteica y las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas.

1.4.1 Análisis del proteoma total

Los estudios iniciales de proteómica de plaquetas se centraron en la caracterización del proteoma utilizando aproximaciones basadas en gel combinadas con espectrometría de masas, que permitían visualizar un gran número de proteínas a partir de mezclas complejas. Algunos de estos estudios estaban dirigidos a mapear el proteoma de plaquetas en estado basal[207,245-248] y otros el proteoma de plaquetas activadas,[13,14,249-251] campo en el que nuestro grupo es experto. Estudios posteriores no basados en gel ampliaron el número de identificaciones, fundamentalmente de proteínas de membrana que no se resolvían bien con las técnicas basadas en gel.[252] Estos estudios han permitido la identificación de numerosas proteínas nuevas en plaquetas, sobre todo receptores y proteínas de señalización, muchos de los cuales son posibles dianas farmacológicas.

También se han llevado a cabo estudios del proteoma plaquetario total comparando diferentes tipos de activación plaquetaria.[253] Otros estudios se han centrado en el análisis de los cambios que sufre el proteoma plaquetario durante el almacenamiento de las plaquetas, lo que resulta de gran importancia en el campo de la transfusión.[208,254,255]

1.4.2 Análisis de modificaciones postraduccionales

Uno de los temas que despierta mayor interés y que debe ser necesariamente abordado, es el estudio de las PTMs. Este tipo de modificaciones proteicas determinan no solo la función de las proteínas sino también su localización, estabilidad, recambio e interacción con otras proteínas o biomoléculas. Se han descrito más de 300 posibles PTMs,[256] muchas de ellas reversibles, con la particularidad de que una misma proteína puede presentar diferentes modificaciones. Así, distintas formas de una misma proteína pueden coexistir en un mismo momento. Como la mayoría de los procesos de regulación plaquetaria suceden a nivel de PTMs, muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en el estudio de los diferentes tipos de PTMs que sufren las proteínas en las plaquetas.

La fosforilación de proteínas juega un papel fundamental en la transducción de señales en plaquetas. La activación plaquetaria se rige principalmente por la fosforilación y desfosforilación de algunos residuos tirosina, serina y treonina de las proteínas. De este

modo la proteómica es la herramienta adecuada para estudiar el estado de fosforilación de las proteínas e incluso localizar el residuo fosforilado. Diversos grupos han focalizado sus esfuerzos en el estudio del fosfoproteoma global,[257,258] mientras que otros lo han hecho en una fracción concreta del fosfoproteoma, como es el caso de las proteínas fosforiladas en tirosina.[13,247] Un análisis del fosfoproteoma plaquetario reveló más de 270 proteínas fosforiladas basalmente en plaquetas.[257] Del mismo modo, se han utilizado diversas aproximaciones proteómicas para la caracterización de las proteínas que sufren fosforilaciones tras la activación plaquetaria con diferentes agonistas.[13,14,247,249,250,259,260] Las estrategias más comúnmente utilizadas para el estudio del fosfoproteoma han sido extensamente revisadas por Zahedi y colaboradores[261] e incluyen técnicas como el radiomarcaje, inmunoprecipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (*immobilized-metal affinity chromatography, IMAC*) o el uso de óxidos de metales como el TiO_2.

La glicosilación también juega un papel importante en la biología de las plaquetas a través de modificación de los receptores, enzimas o proteínas estructurales. Aproximadamente el 50-60% de las proteínas son potencialmente modificables por glicosilaciones.[262] Las glicosilaciones están involucradas en funciones tan importantes como el reconocimiento entre plaquetas, la unión del ligando, la adhesión, la señalización o la unión a patógenos,[263,264] además de relacionarse con diversas enfermedades humanas.[265,266] Las estrategias utilizadas para el estudio del glicoproteoma comprenden el enriquecimiento de proteínas o péptidos que llevan glicanos, la identificación de los sitios de glicosilación y el análisis de restos de carbohidratos (secuencia y ramificación) por espectrometría de masas. A pesar de la importancia del glicoproteoma, muy pocos estudios proteómicos se han centraron en él por el momento y han sido revisados por Burkhart y Sickman.[267]

Las palmitoilaciones son uniones reversibles de lípidos a las proteínas, que funcionan como un mecanismo regulador o interruptor molecular dirigiendo interacciones proteína-lípido y proteína-proteína.[268,269] Estas modificaciones desempeñan un papel en la regulación de las respuestas celulares a los estímulos externos y se sabe que, además de mejorar la hidrofobicidad de las proteínas, están relacionadas con el tráfico de proteínas, su estabilidad y su actividad.[270] Por el momento solo se ha realizado un estudio proteómico en plaquetas al respecto, identificando 215 proteínas palmitoiladas.[271]

1.4.3 Análisis de los subproteomas

Los estudios del proteoma completo de las plaquetas aportan mucha información. Sin embargo, en estos estudios muchas proteínas no están suficientemente representadas debido a su baja abundancia o baja solubilidad, por lo que en ocasiones se recurre al prefraccionamiento de la muestra para disminuir su complejidad y para aumentar la cobertura del análisis. En contraste con los análisis globales, el estudio de subproteomas aporta información novedosa de proteínas poco abundantes (incrementa el número de proteínas identificadas) y proporciona información más detallada sobre la localización de las proteínas o sobre los patrones de PTMs subcelulares.

- **Proteoma de membrana**

El proteoma de membrana comprende todas las proteínas embebidas o asociadas a la bicapa lipídica que rodea a las plaquetas. Su estudio es de gran interés, ya que incluye los receptores que median respuesta celular, los transportadores que intercambian sustancias a través de las membranas, y las enzimas de membrana.[272] La identificación del conjunto de proteínas de membrana de plaquetas en estado de reposo y plaquetas activadas, tiene implicaciones relevantes para la comprensión de los papeles fisiológicos y patológicos de las plaquetas. Se estima que más del 70% de todas las dianas farmacológicas se localizan en las membranas plasmáticas,[273] lo que pone de manifiesto todavía más la importancia del estudio de este subproteoma.

En los primeros estudios de proteómica de plaquetas, las proteínas de membrana estaban infrarrepresentadas debido a su baja abundancia y a su baja solubilidad en los tampones convencionales. Hasta no hace demasiado tiempo, pocas proteínas de membrana habían sido identificadas, pero en la última década varios trabajos se han centrado en su estudio. El primero de estos estudios fue el de Moebius y colaboradores quienes en 2005 identificaron 83 proteínas de membrana.[274] El número de proteínas identificadas fue ampliado por Senis y colaboradores en 2007 hasta las 136 proteínas,[260] pero sin duda fue el trabajo desarrollado por Lewandoswski y colaboradores el que ha reportado el mayor número de proteínas de membrana plaquetaria hasta el momento (626).[275] Otros trabajos más funcionales se han publicado sobre este tema.[276-278]

Para enriquecer las proteínas integrales de membrana se utilizan varias técnicas, incluyendo precipitación química, gradientes de densidad de centrifugación, cromatografía de afinidad y raspado de membrana.

- **Secretoma**

Como ya se ha comentado, el secretoma plaquetario comprende todas las proteínas liberadas por las plaquetas, incluyendo gránulos alfa, gránulos densos, microvesículas y exosomas.

Algunos estudios abordan la investigación de todo el conjunto de proteínas liberado, mientras que otros se centran en una parte específica del mismo. El estudio del secretoma ha aumentado nuestra comprensión acerca del modo en el que las proteínas secretadas por las plaquetas modifican las respuestas extracelulares y la patogénesis de ciertas enfermedades. El primer análisis de proteínas secretadas por plaquetas activadas fue llevado a cabo por Coppinger y colaboradores en 2004 identificando más de 300 proteínas.[85] El secretoma de plaquetas fue revisado por el mismo grupo en 2007, en un trabajo en el que investigaban el efecto de la aspirina en el perfil de las proteínas liberadas tras la activación con varios agentes.[203] Utilizando una estrategia diferente, Piersma y colaboradores incrementaron hasta 716 el número de proteínas identificadas en el secretoma de plaquetas.[279] Un estudio de Jonnalagada y colaboradores ha demostrado recientemente que la secreción plaquetaria es heterogénea y dependiente de agonista,[34] lo que está en línea con un estudio publicado recientemente por nuestro grupo.[280]

En los estudios del secretoma total las plaquetas son estimuladas para inducir la secreción de proteínas, poniendo especial cuidado en evitar la lisis celular, y a continuación se obtiene el producto liberado mediante un proceso de centrifugación para eliminar las plaquetas enteras.

- **Proteoma de las microvesículas**

Aunque las microvesículas (MVs) forman parte del secretoma pueden ser estudiadas de forma independiente. Como se ha explicado con anterioridad, aproximadamente el 90% de las MVs del plasma proceden de plaquetas en individuos sanos[44] y la activación plaquetaria, ya sea fisiológica o patológica, promueve la liberación de microvesículas contribuyendo su aumento en plasma.[42,43] Además se ha demostrado que el proteoma de las MVs derivadas de plaquetas varía en función del estímulo que desencadeno su liberación.[281,282]

Los estudios proteómicos más completos de microvesículas derivadas de plaquetas fueron el de García y colaboradores en 2005, identificando 578 proteínas,[42] y el de Capriotti y colaboradores en 2013, identificando 603 proteínas, 203 de ellas nuevas.[283]

Como las microvesículas son liberadas al plasma, su aislamiento puede realizarse antes o después de la estimulación de las plaquetas. En los estudios de MVs plasmáticas las microvesículas se aíslan a partir del plasma pobre en plaquetas (*platelet-poor plasma*, PPP),

mientras que en los estudios de microvesículas de plaquetas éstas son aisladas tras la activación de las plaquetas purificadas. En cualquier caso la eliminación de células residuales es fundamental, y en última instancia se realiza el aislamiento de las microvesículas por el método seleccionado. El aislamiento de microvesículas suele realizarse mediante ultracentrifugaciones o utilizando kits de extracción comerciales. Una revisión reciente de Smalley y colaboradores provee información detallada en cuanto al aislamiento de microvesículas de plaquetas, su proteoma y la contribución de éstas a las enfermedades humanas.[284]

- **Proteoma de gránulos plaquetarios**

Cuando las plaquetas son estimuladas con agonistas fuertes liberan el contenido de sus gránulos como consecuencia del aumento de Ca^{2+} citosólico. Del mismo modo que las MVs, estos gránulos forman parte del secretoma pero pueden ser aislados y estudiados de forma independiente. La liberación de los gránulos contribuye al aumento de la superficie de la membrana de las plaquetas debido a la fusión de sus membranas, y la liberación de su contenido a la sangre tiene grandes consecuencias tanto a nivel fisiológico (hemostasia) como patológico (trombosis, aterosclerosis y otros procesos patológicos). Como ya se ha mencionado, los gránulos de plaquetas contribuyen a la propagación de la activación plaquetaria y, por otra parte, a procesos tales como la coagulación, la defensa del huésped, la angiogénesis, la cicatrización de heridas y la inflamación.[40] Las enfermedades de almacenamiento de plaquetas (o *storage pool diseases*) son trastornos genéticos raros que afectan predominantemente a los gránulos plaquetarios cuyos síntomas ilustran perfectamente la importancia de la secreción plaquetaria en la hemostasia.

Existen distintos subtipos de gránulos α con distinto contenido proteico[39] que son liberados de forma diferencial en función del estímulo. A pesar de la enorme importancia de los gránulos α, sólo un grupo ha estudiado su proteoma en detalle.[285,286] Los gránulos densos contienen predominantemente moléculas pequeñas, y el estudio específico de su contenido ha sido únicamente abordado por el grupo de Hernández-Ruiz.[37] Los resultados de este estudio revelaron un bajo número de proteínas, lo que es consistente con la gran proporción de pequeñas moléculas que albergan.

El aislamiento de los gránulos plaquetarios se suele llevar a cabo tras la estimulación plaquetaria que provoca su liberación, y a continuación se eliminan los restos celulares por centrifugación. Entre las técnicas para el enriquecimiento de los gránulos destaca la centrifugación utilizando gradientes de sacarosa y la eliminación por centrifugación de los restos celulares y por ultracentrifugación de las microvesículas.

El análisis de subproteomas, así como los estudios de las vías de señalización, han proporcionado información suficiente como para que podamos afirmar que hoy en día un porcentaje importante del proteoma plaquetario ha sido descubierto.

1.4.4 Proteómica de plaquetas en enfermedades cardiovasculares

Durante la última década el potencial de la proteómica para el estudio de enfermedades complejas ha aumentado exponencialmente. Las nuevas tecnologías altamente sensibles y la evolución de las estrategias de análisis (avances en el estudio de subproteomas,[287,288] mejora en la visualización de proteínas poco abundantes…[289,290]) han permitido acceder a proteínas de baja abundancia aumentando el éxito en la detección de nuevos biomarcadores.[239] De este modo, la proteómica se ha convertido en una herramienta indispensable para el descubrimiento de muchos receptores plaquetarios y proteínas de señalización, enriqueciendo la comprensión de la función biológica de estas células y potenciando la búsqueda de nuevos biomarcadores y antiagregantes plaquetarios.[239]

Los métodos de preparación y manipulación de muestras para los estudios de proteómica de plaquetas en enfermedades cardiovasculares han sido recientemente revisados por nuestro grupo[51] y se han descrito brevemente en la sección 1.3.2 de esta introducción. El esquema general de un estudio proteómico de plaquetas en enfermedades cardiovasculares puede ser consultado en la Figura 8.

En los últimos años los estudios del proteoma plaquetario se han ido focalizando en enfermedades con implicaciones plaquetarias y en la identificación de los cambios funcionales que surgen en diferentes patologías.[291] Así se ha comenzado a investigar por proteómica el papel que desempeñan las plaquetas en diferentes patologías como la uremia,[292,293] la fibrosis quística,[294] enfermedades degenerativas como Alzheimer o Parkinson,[295] defectos de función plaquetaria como el síndrome de plaquetas grises (*gray platelet síndrome*),[285,286] el trastorno plaquetario de Quebec (*Quebec platelet disorder*)[296] o el síndrome de depósito de gránulos delta (*δ-storage pool disease*).[297] Además, la proteómica de plaquetas también ha contribuido en gran medida al campo de la transfusión sanguínea mediante el estudio de los cambios que se producen durante el almacenamiento de las plaquetas,[208,209,254,255,298,299] pero sin duda alguna, el estudio de las enfermedades cardiovasculares y otras condiciones relacionadas con las mismas son las áreas clínicas en las que la proteómica de plaquetas ha tenido una mayor actividad.[51]

Los estudios de proteómica de plaquetas en el contexto de las enfermedades cardiovasculares han servido para arrojar luz sobre los mecanismos moleculares que

regulan la actividad plaquetaria en diferentes contextos patológicos. Hasta el momento se han publicado varios estudios relacionados con síndromes coronarios agudos,[175,300-302] enfermedades coronarias estables,[175,300-303] trombosis arterial,[304] hipertensión[202,305] y diabetes.[306] Como en todo estudio clínico, el fin último es identificar posibles biomarcadores y dianas farmacológicas cuyo descubrimiento nos acerque hacia la aplicación de la proteómica para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiovasculares, así como su tratamiento médico,[307] pero además, los estudios proteómicos pueden abordar cuestiones de gran relevancia clínica como las diferencias en la respuesta a los tratamientos antiplaquetarios o el potencial patológico de plaquetas en la génesis de enfermedades cardiovasculares.[308] Algunos de estos estudios en los que nuestro grupo ha sido pionero se han centrado en la búsqueda de biomarcadores y dianas farmacológicas de plaquetas en pacientes con enfermedad coronaria estable y síndromes coronarios agudos.[175,300-302,309] En el caso de los SCAs, los estudios realizados reflejan en líneas generales una sobrerregulación de proteínas de señalización y de proteínas de citoesqueleto, además de una disminución de proteínas antioxidantes.[175,300-302] Estos datos están en línea con el aumento de los niveles de activación plaquetaria detectados en pacientes con síndromes coronarios agudos, que podrían ser responsables de los eventos aterotrombóticos relacionados con el evento. Por otro lado, los estudios de pacientes con enfermedad coronaria estable también reflejan un estado hiperreactivo de las plaquetas.[302,309]

También se han realizado estudios de proteómica de plaquetas en otras patologías relacionadas con las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión[202,305] o la diabetes,[306] y los resultados también están en consonancia con el estado hiperreactivo de las plaquetas en esas patologías. En el caso de la diabetes, los resultados parecen indicar que la disfunción plaquetaria está mediada por la calpaína, por lo que se propone la inhibición de la activación de la calpaína como una manera para frenar el desarrollo de aterotrombosis y preservar la función plaquetaria.[306]

Otra línea de estudio interesante es la evaluación del efecto que tienen ciertos fármacos en el proteoma plaquetario.[202,303,310,311] Los estudios realizados hasta el momento muestran que el tratamiento con terapia doble antiagregante parece disminuir la reactividad de las plaquetas, como era de esperar.[311] Otro dato interesante proviene de estudios que indican que las plaquetas de pacientes resistentes a la aspirina pueden presentar un mayor estado de apoptosis que los pacientes sensibles a la aspirina.[310]

El diagnóstico precoz y el hallazgo de dianas terapéuticas mejoran los tratamientos y la supervivencia de los pacientes. Cuando un paciente se presenta con problemas cardiovasculares en el servicio de urgencias de un hospital, resulta trascendental un correcto y rápido diagnóstico. Aquí es donde reside la importancia de encontrar parámetros bioquímicos que funcionen como biomarcadores de la enfermedad y ayuden al clínico a diferenciar rápidamente el problema que aqueja al paciente. Los marcadores actuales como la troponina, la creatina quinasa total (CK) o la creatina quinasa MB (CK-MB), funcionan adecuadamente para detectar la necrosis miocárdica. Sin embargo la identificación de un biomarcador que permitiese la detección temprana de la isquemia, antes de llegar a producirse necrosis miocárdica, seria de suma importancia y podría llegar incluso a cambiar la medicina moderna en este campo.[312] Por otro lado, la identificación de dianas moleculares potencialmente atacables para modificar el comportamiento de las plaquetas es un asunto que desborda interés. Numerosos estudios han demostrado el efecto beneficioso de la combinación de inhibidores de la COX e inhibidores del receptor de ADP, $P2Y_{12}$, en diferentes situaciones clínicas agudas, como es el caso de los síndromes coronarios agudos. Sin embrago, la utilización de estas dianas presenta la desventaja de que en muchas ocasiones los pacientes continúan sufriendo complicaciones aterotrombóticas.[313-316] En este punto radica la importancia de profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de activación plaquetaria, ya que un mayor conocimiento permitirá el desarrollo de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas nuevas todavía no completamente delimitadas.

Todavía nos encontramos en las primeras etapas de la aplicación de la proteómica de plaquetas a la clínica, ya que sólo en los últimos 7 años se ha aplicado a estudios clínicos, y más en concreto a la investigación cardiovascular. Aunque es un trabajo complejo, la aplicación de una metodología adecuada, protocolos estandarizados y técnicas de fraccionamiento subcelular, junto con los avances recientes en la proteómica cuantitativa, permitirán la obtención de resultados prometedores para el descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas. Los recientes avances en este campo nos permiten ser moderadamente optimistas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. Objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los objetivos generales planteados en la presente tesis doctoral son:

I. Identificar, mediante proteómica, nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas antiplaquetarias relevantes en infarto agudo de miocardio.

II. Analizar en profundidad el nivel de activación de la vía de señalización del receptor de colágeno glicoproteína VI (GPVI) en plaquetas de pacientes con infarto agudo de miocardio con vistas a postular este receptor como diana terapéutica relevante en dicha patología.

III. Caracterizar el potencial del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 en la inhibición de GPVI y establecer las bases para la identificación de pequeñas moléculas inhibidoras de GPVI.

De los objetivos generales se derivan los siguientes objetivos específicos:

1. Proporcionar información novedosa sobre proteínas de las microvesículas derivadas del plasma que pudieran estar jugando un papel relevante en los eventos fisiopatológicos que subyacen a un IAMCEST y que pudieran servir como biomarcadores o dianas terapéuticas para la enfermedad.

2. Analizar el proteoma de las plaquetas procedentes de sangre arterial del lugar de la oclusión, en comparación con sangre arterial periférica, en pacientes con IAMCEST, con el fin de ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología del infarto, e identificar proteínas alteradas que pudieran servir como biomarcadores o dianas terapéuticas. El estudio de las plaquetas en contacto con el trombo podría reflejar fielmente lo que sucede durante el infarto.

3. Analizar el estado de activación de la vía de señalización de GPVI en plaquetas obtenidas a partir de sangre periférica venosa de pacientes con IAMCEST para confirmar su estado de activación.

4. Analizar los niveles de activación de la vía de señalización de GPVI en plaquetas procedentes de sangre arterial intracoronaria en contacto directo con el trombo (lugar

de la oclusión), con el fin de determinar si presentan mayores niveles de activación de la vía que aquellas alejadas del lugar de la oclusión.

5. Testar el efecto inhibitorio que tiene el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 sobre el receptor plaquetario GPVI, tanto a nivel de agregación como a nivel bioquímico.

6. Determinar cuál de los receptores de colágeno presentes en las plaquetas es el principal responsable de la agregación/activación inducida por colágeno.

7. Buscar pequeños inhibidores del receptor de colágeno GPVI para su uso como potenciales agentes antitrombóticos mediante técnicas de cribado de alto rendimiento (*high-throughput screening,* HTS) en combinación con estudios de simulación computacional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para alcanzar los objetivos anteriores se han planteado los siguientes estudios:

1. Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST.
2. Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo.
3. Estudios de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST:
    3.1 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre venosa de pacientes con IAMCEST.
    3.2 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre arterial de pacientes con IAMCEST.
4. Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI:
    4.1 Inhibición de la vía de señalización de GPVI mediante el fragmento Fab del anticuerpo OM2.
    4.2 Estudio de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y CRP e inhibición de la misma con inhibidores específicos de los principales receptores de colágeno.
    4.3 Búsqueda de pequeños inhibidores de GPVI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. Material y métodos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 Material

Los materiales de interés utilizados en esta tesis se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de materiales utilizados y casas comerciales.

MATERIAL	CASA COMERCIAL
Equipos	
Agregómetro (940-2D)	Chrono-log
Centrífugas (5415R, 5702)	Eppendorf
Contador de plaquetas (Z1 Coulter Particle Counter)	Beckman
Citómetro de flujo BD FACS Canto II	BD Biosciences
Escáners de fluorescencia (Typhoon 9410 y FLA 7000)	GE Healthcare
Espectrofotómetro (Genesys 20)	Thermo Scientific
Espectrómetros de masas (MALDI-TOF/TOF 4800, EASY-nLC)	ABSciex, Bruker
Hamamatsu FDSS 7000EX	Hamamatsu Photonics
Microscopio electrónico Fhilips CM-12	Philips, FEI Company
Nanosizer ZS	Malvern
Rotor SW55Ti	Beckman Coulter
Sistemas de electroforesis (Ettan Dalt Six, Multiphor II, XCell SureLock)	GE Healthcare, Invitrogen,
Sonicador (Sonifier 150)	Branson
SpeedVac	Thermo Scientific
Ultracentrífuga	Beckman Coulter
Programas de análisis de imagen	
ImageMeter	Flashscript
SameSpots	Nonlinear dynamics
Programas estadísticos	
SPSS Statistics 20	IBM, Armonk
GraphPad Prism	GraphPad
Bases de datos	
UniProt	UniProt Consortium
Plateletomics	
Motores de búsqueda	
Mascot	Matrix Science
Otros	
FACSDiva 6.1.2	BD Biosciences
4000 Series Explorer Software	Applied Biosystems
GPS Explorer Software	ABSciex
Data analysis y BioTools	Bruker

3.2 Métodos

La composición de todos los tampones y soluciones utilizados en esta tesis doctoral se detalla en al Apéndice I.

3.2.1 Selección de muestras

Los estudios que conforman esta tesis comprenden muestras de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST), muestras de controles con cardiopatía isquémica crónica estable que habían tenido un IAMCEST previamente (CROIAMCEST) y muestras de donantes sanos.

Las muestras de pacientes fueron recogidas en el Servicio de Cardiología y Unidad coronaria del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (estudios de plaquetas y microvesículas) y en el Servicio de Cardiología del Hospital Virgen de la Salud de Toledo (estudio de microvesículas), tras firmar un consentimiento informado. Todos los estudios que incluyen pacientes fueron aprobados por el Comité Autonómico de Ética de Investigación de Galicia y se desarrollaron de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Las muestras de los donantes sanos se recogieron en el *Servizo de Vixilancia da Saúde* de la *Universidade de Santiago de Compostela*.

3.2.1.1 Características de los pacientes y recogida de muestras

Los pacientes agudos (IAMCEST) incluidos es estos estudios se caracterizaban por ingresar en el hospital con dolor torácico de al menos 20 min de duración con las enzimas cardíacas elevadas y con elevación del segmento ST de al menos 0,1 mV en dos o más derivaciones contiguas, o por presentar bloqueo de la rama izquierda de nueva aparición. Tras su llegada a la sala de hemodinámica de la Unidad Coronaria y antes del cateterismo se les realizó terapia de reperfusión urgente para restaurar el flujo sanguíneo. Las muestras fueron obtenidas en las primeras 12 horas siguientes al inicio de los síntomas, tras la llegada al servicio de urgencias. A la mayoría de los pacientes se les administró aspirina e inhibidores $P2Y_{12}$, principalmente clopidogrel, antes de la extracción de sangre. Los criterios de exclusión fueron enfermedades inflamatorias o neoplásicas, trastornos de coagulación, trastornos plaquetarios, otras cardiopatías significativas excepto hipertrofia ventricular izquierda secundaria a la hipertensión, tratamiento farmacológico crónico (a excepción de los medicamentos necesarios para el tratamiento de la aterosclerosis clínica o de sus factores de riesgo preexistentes), y haber sufrido procedimientos quirúrgicos,

traumatismos relevantes, eventos tromboembólicos o procedimientos de revascularización en los tres meses anteriores.

Los controles (CROIAMCEST) utilizados en estos estudios fueron seleccionados do modo que no hubiese diferencias estadísticamente significativas con el grupo de agudos en parámetros como tratamientos antiplaquetarios, edad, sexo y diabetes. Estos pacientes se caracterizaban por sufrir cardiopatía isquémica crónica estable definida por uno de las siguientes características: angina estable con estenosis de una de las arterias coronarias de al menos un 70%, historia de angioplastia coronaria, *by-pass* de la arteria coronaria o historia de síndrome coronario agudo. Otro criterio de selección fue que estos pacientes no hubiesen presentado ningún evento cardiovascular agudo al menos un año antes de la inclusión en el estudio.

Tras obtener el consentimiento de los pacientes agudos y controles se extrajeron 25 mL de sangre venosa o 50 mL de sangre arterial (25 mL de intracoronaria y 25 mL de periférica) según el tipo de estudio. Para los estudios venosos la sangre fue extraída de la vena cubital utilizando agujas de calibre 21g tras aplicación de un torniquete ligero, y recolectada en tubos de polipropileno Vacuette® con un 3,2% de citrato sódico. Los primeros mL de sangre fueron descartados. Los estudios de sangre arterial incluían dos tipos de muestras de pacientes agudos: muestras de sangre intracoronaria y muestras de sangre periférica. Las muestras de sangre intracoronaria fueron extraídas durante el procedimiento normal de hemodinámica utilizando un catéter Pronto V3 (Vascular Solutions), que obstruye el flujo anterógrado permitiendo la recogida de sangre en contacto con el trombo [327,328]. Las muestras de sangre arterial periférica se obtuvieron de la arteria radial a través de la cual se insertó el catéter. En ambos casos la sangre arterial extraída con el catéter se recolectó en una jeringa y se trasladó finalmente a tubos de plástico Vacuette® con un 3,2% de citrato sódico. Aunque el catéter utilizado para la extracción de ambos tipos de muestra arterial fue el mismo, la sangre periférica se extrajo en primer lugar para evitar contaminaciones con sangre intracoronaria.

3.2.1.2 Características de los donantes sanos y recogida de muestras

Para la selección de los donantes sanos el único criterio de exclusión fue el haber tomado medicación antiplaquetaria en los 10 días anteriores a la extracción de la muestra. La sangre se obtuvo de la misma manera que la sangre venosa de pacientes, pero en este caso se extrajeron entre 25 y 50 mL por donante, según las necesidades del estudio.

3.2.2 Aislamiento de plaquetas

Todas las muestras de sangre fueron procesadas con un margen riguroso de dos horas desde el momento de la extracción para evitar activaciones espontáneas que pudiesen alterar el proteoma. Las plaquetas se aislaron mediante un procedimiento estandarizado con el fin de limitar la contaminación con otras células sanguíneas y proteínas del plasma, minimizando además la posibilidad de una activación plaquetaria indeseada debida a la manipulación de las muestras.[211] Este procedimiento se esquematiza en la Figura 13 y se explica a continuación:

- Se calienta en un baño térmico a 30ºC ácido-citrato-dextrosa (ACD) y tampón de Tyrode modificado (MTB) que se suplementa con 5 mM de glucosa justo antes de empezar el experimento.
- Se añade a cada tubo de sangre un 10% (v/v) de ACD para mantener el pH del medio controlado (aproximadamente 6,6) y evitar la agregación plaquetaria. Se mezcla invirtiendo suavemente los tubos tres veces.
- La sangre se pasa a tubos de polipropileno adaptados para una centrífuga hematológica y se centrifuga durante 20 min a 200 g. Esta centrifugación separa la sangre en una fase inferior roja compuesta de eritrocitos y una parte superior amarillenta donde se encuentra el plasma rico en plaquetas (*platelet-rich plasma*, PRP), ambas separadas por una interfase con forma de disco blanquecino compuesta de leucocitos.
- Se recogen únicamente las 3/4 partes superiores de la fracción de PRP para asegurarse de evitar la contaminación con leucocitos, y se pasa a un tubo de polipropileno de 50 mL.
- Se añade prostaglandina I_2 (PGI2) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU) 1 µM para evitar que se activen las plaquetas por las fuerzas de centrifugación. Se mezcla lentamente por inversión y se centrifuga 10 min a 1000 g. En esta fase se consigue separar las plaquetas por deposición en el fondo del tubo. El sobrenadante es el plasma pobre en plaquetas (*platelet-poor plasma*, PPP) que se utilizará en el caso de los estudios de microvesículas.
- El sedimento de plaquetas se resuspende en 150 µL de ACD y 1 mL de MTB, se mezcla y se incrementa el volumen con MTB hasta 25 mL y se añaden 3 mL de ACD.
- Para realizar el contaje de las plaquetas lo primero es preparar el contador de plaquetas (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter) haciendo dos medidas del blanco (10 mL de Isoton II) que den por debajo de $1x10^6$ partículas. A continuación se diluyen 5 µL de suspensión de plaquetas en 10 mL de tampón de contaje Isoton II (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) y se mide por duplicado controlando que el número de partículas/células que pudieran estar contaminando la muestra sea menor a $1x10^6$. El

contador se calibra de modo que sólo cuente como plaquetas aquellas células de un tamaño comprendido entre 1,785 y 3,855 µm.

- Se vuelve a añadir PGI2 1µM a la suspensión de plaquetas y se centrifuga 10 min a 1000g para eliminar contaminaciones plasmáticas.
- El sedimento de plaquetas se resuspende de nuevo en la cantidad necesaria de MTB para dejar las plaquetas a la concentración deseada en función del estudio (entre 4 y $8x10^8$ plaquetas por mL), y siempre por debajo de $1x10^9$ plaquetas por mL para evitar agregación espontánea.
- Se deja reposar la muestra a temperatura ambiente durante 30 min para que la PGI2 deje de funcionar.
- En los estudios que no implican activaciones las plaquetas se dejan a una concentración de $8x10^8$, se dividen en alícuotas de 500 µL y se lisan con otros 500 µL de tampón de lisis 2X suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras dejar reposar en hielo durante 15 min, se centrifugan las alícuotas a 10000 g durante 5 min. Se pasa el sobrenadante a un nuevo tubo y se realizan lisados totales de la siguiente manera: 32 µL de muestra + 8 µL de tampón Laemmli 5X. Se hierven los lisados 5 min a 100°C. También se separan alícuotas para cuantificar y se guardan junto con las muestras y los lisados a -80°C hasta el momento de su utilización.

En el caso de los estudios en los que se llevan a cabo activaciones se procedió como se explica en la siguiente sección.

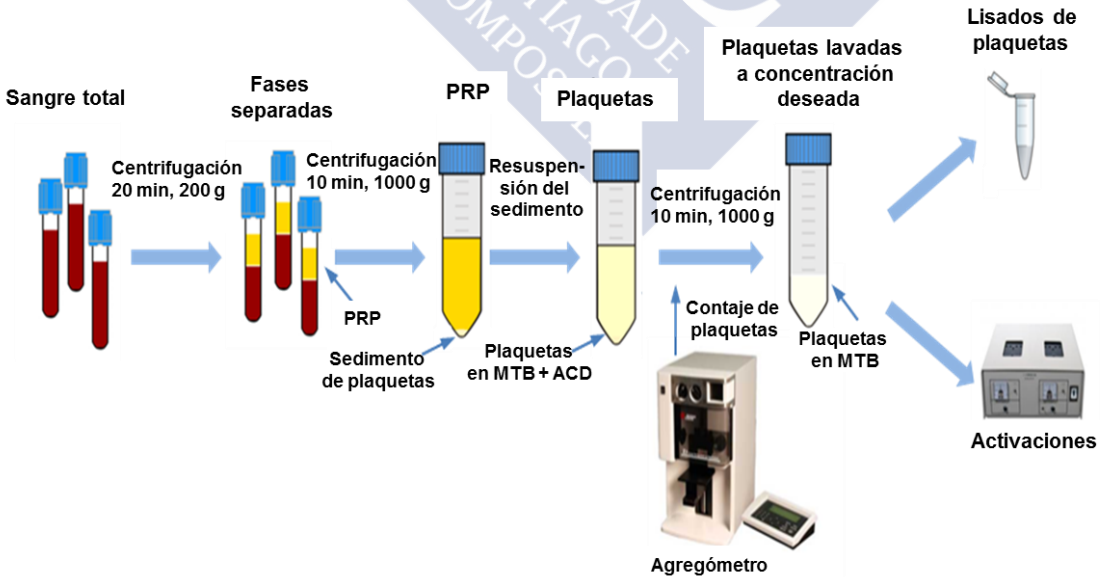


Figura 13 - Diagrama representativo del método de aislamiento de plaquetas.

3.2.3 Activación e inhibición de plaquetas

3.2.3.1 Activación para estudios de agregación

Para aquellos estudios en los que se pretende estudiar la respuesta de agregación tras la estimulación plaquetaria el protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se dejan las plaquetas a una concentración de 3 ó $4x10^8$ por mL en función del estudio y no se añaden inhibidores de la agregación ni de los mediadores secundarios.
- En un agregómetro Chrono-log se calientan a 37 ºC alícuotas de 500 µL de plaquetas (1,5 o $2x10^8$ plaquetas) durante 4 min sin agitación y durante 1 min con agitación constante (1200 rpm).
- A continuación se estimulan las plaquetas durante 5 min con agitación constante (1200 rpm) utilizando el agonista que corresponda o su diluyente como control de la agregación basal, y se registran las curvas de agregación en un ordenador acoplado al agregómetro. Las plaquetas se desechan tras su activación.

3.2.3.2 Activación para estudios bioquímicos

En el caso de los estudios destinados al análisis bioquímico tras la activación plaquetaria se procedió de la siguiente manera:

- Se dejan las plaquetas a una concentración de $6x10^8$ plaquetas por mL (estudios de inmunoprecipitación) o de $4x10^8$ plaquetas por mL (estudios de inmunodetección) y se añade sobre el volumen total de las plaquetas 1 mM de EGTA o 900 µM de integrilina 5 min antes de la activación plaquetaria para inhibir la agregación. Además se añaden inhibidores de los mediadores secundarios (2 U/mL apirasa y 10 mM indometacina) para evitar la amplificación de la activación plaquetaria inducida por el ADP y los tromboxanos liberados por las propias plaquetas activadas.
- Se dividen las plaquetas en alícuotas de 500 µL (2 ó $3x10^8$ plaquetas) y se calientan a 37ºC durante 2 min sin agitación y durante 30 segundos con agitación constante a 1200 rpm en un agregómetro Chrono-log.
- Se estimulan las plaquetas durante 90 segundos en el caso de CRP, colágeno y trombina, o durante 4 min en el caso de rhodocytin. Las estimulaciones se realizan en agitación constante (1200 rpm) con el agonista adecuado o el diluyente del agonista como control.
- Se para la reacción de activación lisando las plaquetas con 500 µL de tampón de lisis 2X suplementado con inhibidores y se dejan reposar en hielo durante 15 min.

- Se separa una alícuota para cuantificación y se congelan las muestras a -80ºC, o se procede directamente con el siguiente paso (inmunoprecipitación o precipitación de proteína).

3.2.3.3 Inhibición de GPVI

Para el estudio de la inhibición de GPVI se utilizó el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 (Fab-OM2) cedido por Otsuka Maryland Medicinal Laboratories, Rockville, Japón. El estudio de la inhibición de dicho receptor por parte de Fab-OM2 se realizó tanto a nivel de agregación como bioquímico, como se explica a continuación.

Estudio de inhibición de la agregación tras la estimulación de GPVI:

- Se añade la cantidad deseada del inhibidor Fab-OM2 sobre 500 µL de plaquetas ($1,5x10^8$ plaquetas) justo antes de su activación en el agregómetro.
- Se calientan las alícuotas a 37ºC durante 10 min sin agitación para dejar actuar el inhibidor, y durante 1 min con agitación constante (1200 rpm) en un agregómetro Chrono-log.
- Finalmente se realizan estimulaciones durante 5 min y se registra la agregación.

Estudio de inhibición de la activación de GPVI:

- En estos estudios se añade un inhibidor de la agregación (900 µM de integrilina) e inhibidores de los mediadores secundarios (2 U/mL apirasa y 10 mM indometacina) para evitar la amplificación de la activación plaquetaria inducida por el ADP y los tromboxanos liberados por las propias plaquetas activadas.
- Se añade la cantidad deseada del inhibidor Fab-OM2 sobre 500 µL de plaquetas ($4x10^8$ plaquetas) justo antes de su activación en el agregómetro.
- Se calientan las alícuotas a 37ºC durante 10 min sin agitación para dejar actuar el inhibidor, y durante 30 segundos con agitación constante (1200 rpm) en un agregómetro Chrono-log.
- Finalmente se realizan estimulaciones durante 90 segundos con los agonistas deseados, salvo en el caso de la rhodocytin en donde las plaquetas son estimuladas durante 4 min.

3.2.4 Precipitación de proteína a partir de lisados de plaquetas para estudios proteómicos por 2D-DIGE

Las proteínas se extrajeron a partir de las suspensiones de plaquetas congeladas y lisadas, utilizando precipitación con 20% de ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*, TCA) en acetona según el siguiente protocolo:

- Sobre las muestras todavía congeladas se añade TCA/Acetona 60% (m/v) en una proporción 1:2 (v/v) y se dejan reposar en hielo durante 45 min. La concentración final de TCA es del 20%.
- A continuación se centrifugan las muestras durante 2 min a 10000 g y se descarta el sobrenadante.
- Se lavan las muestras con 500 µL de acetona fría para eliminar los posibles lípidos residuales y se aplica sonicación ligera a pulsos de 1 segundo para disgregar el sedimento formado. Se centrifuga durante 2 min a 10000 g y se descarta el sobrenadante. Este paso se realiza por duplicado.
- Finalmente se resuspenden las muestras en el tampón de muestra 2D-DIGE (50 µL en el caso de estudios plaquetarios y 40 µL en el caso del estudio de MVs) y se congelan o se procede directamente con el siguiente paso.

3.2.5 Inmunoprecipitación de proteína para estudios proteómicos

En los estudios proteómicos y bioquímicos de la vía de GPVI se realizó inmunoprecipitación de las proteínas fosforiladas en tirosina a partir de muestras congeladas y lisadas. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- El primer paso es el preaclarado de la muestra para eliminar posibles interacciones inespecíficas entre proteínas y bolitas de sefarosa recubiertas de proteína A (p*rotein A sepharose,* PAS) o con el anticuerpo de la inmunoprecipitación. Este preaclarado se realiza con bolitas de PAS previamente hidratadas con TBS-T en una relación 1:1 (v/v). Se añaden 25 µL de PAS hidratado a cada muestra y se incuban durante 1 h a 4ºC en rotación.
- Una vez preaclaradas, se centrifugan las muestras a 10000 g y a 4ºC durante 10 min, y se recoge el sobrenadante. En este punto se preparan los lisados totales (32 µL de muestra y 8 µL de tampón de Laemmli 5X), se hierven durante 5 min y se guardan a -80ºC hasta su uso.

- Tras dejar reposar los lisados preaclarados en hielo durante 20 min, se añaden 10 µg del anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 conjugado a agarosa (Millipore) a cada alícuota y se dejan en rotación a 4ºC toda la noche para que la proteína interaccione con el anticuerpo.
- A la mañana siguiente se centrifugan las muestras durante 1 min a 10000 g y a 4ºC. Se retira el sobrenadante y se lava el sedimento de bolitas una vez con 1 mL de tampón de lisis 1X y dos veces más con 1 mL de TBS-T, intercalando centrifugaciones de 1 min a 10000 g y a 4ºC y descartando el sobrenadante.
- Finalmente se añaden 10 µL de tampón de Laemmli 2X sobre las bolitas para liberar la muestra unida al anticuerpo, se mezcla en el agitador de vórtice y se hierve durante 5 min. Se centrifuga de nuevo 1 min a 10000 g y se pasa la muestra a un nuevo microtubo para eliminar las bolitas.

3.2.6 Preparación de plasmas y aislamiento de microvesículas

Como se ha explicado con anterioridad, durante el proceso de aislamiento de plaquetas se obtiene una fracción de plasma pobre en plaquetas (PPP). A partir de ahí se continuó de la siguiente manera para obtener el plasma libre de plaquetas (*platelet free plasma* o PFP):

- Se centrifuga el PPP durante 10 min a 1500 g para eliminar plaquetas.
- Se recoge el sobrenadante y se vuelve a centrifugar 2 min a 15000 g para eliminar completamente cualquier resto de plaquetas. De esta forma se obtiene el PFP.
- Se divide el PFP en alícuotas y se congela a -80°C hasta su procesamiento.

Se realizaron pruebas para la extracción de microvesículas (MVs) basadas en diferentes protocolos publicados. Los mejores resultados se obtuvieron con el protocolo de Ramacciotti y colaboradores[317] con la adición de un lavado final en PBS. La extracción de microvesículas plasmáticas se realizó como sigue:

- El volumen de PFP utilizado para la extracción de MVs son 7,2 mL por paciente, y se utilizan 6 tubos de ultracentrífuga. En cada tubo se diluyen 1,2 mL de PFP en 3 mL de tampón HEPES y se ultracentrifuga durante 90 min a 200000 g y 4°C.
- Tras retirar el sobrenadante se resuspende el sedimento de MVs en 4 mL de KBr 0,25 M para solubilizar proteínas plasmáticas y se incuba en hielo durante 20 min. Se ultracentrifuga de nuevo en las mismas condiciones.

- Se retira el sobrenadante, se lava el sedimento con 4 mL de PBS 1X y se realiza una última ultracentrifugación en las mismas condiciones.
- Tras eliminar el sobrenadante se deja secar el sedimento de MVs al aire y finalmente se disuelve en 40 µL de tampón 2D-DIGE que se van trasladando de tubo en tubo hasta disolver por completo todas las MVs. Finalmente se aparta una alícuota para cuantificación y se guardan las muestras a -80°C.

3.2.7 Cuantificación de proteína

Para cuantificar proteína se utilizó el método Bradford[318] y se optó por utilizar el reactivo Coomassie Plus (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) por su compatibilidad con el tampón de muestra 2D-DIGE. El protocolo de cuantificación se realizó como sigue:

- Se atemperan 50 mL de Coomassie Plus al mismo tiempo que se van descongelando las muestras en hielo.
- Se realiza por duplicado una curva patrón que consiste en seis diluciones consecutivas 1:2 de la BSA concentrada (2 µg/µL) utilizando como diluyente el tampón 2D-DIGE en que se encuentra disuelta la muestra. Para ello se dispensan 20 µL de diluyente a cada tubo de la recta y se añaden 20 µL del BSA concentrada en el primer tubo que se van trasladando en serie al resto de los tubos. De esta manera se obtiene una curva patrón con seis puntos con las siguientes concentraciones de BSA: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/mL.
- Se añaden 600 µL de Coomassie Plus a cada tubo, se mezclan en el agitador de vórtice y se dejan reposar durante 5 min.
- Para la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro se selecciona la longitud de onda de 595 nm y se hace un blanco con tampón de 2D-DIGE (20 µL) y Coomassie (600 µL). Se traspasa el contenido de cada tubo a cubetas de espectrofotómetro y se leen las absorbancias. La variación entre los duplicados no puede ser mayor de un 10%.
- Las muestras se preparan también por duplicado añadiendo normalmente 2 µL (según su concentración) sobre 600 µL de Coomassie y se mezclan en el agitador de vórtice. El blanco de las muestras se realiza añadiendo el mismo volumen que de las muestras (normalmente 2 µL) sobre 600 µL de Coomassie.
- Tras dejar reposar 5 min se mide la absorbancia a la misma longitud de onda que la utilizada para la recta. En este caso la variación entre los duplicados tampoco puede ser mayor de un 10%.
- Finalmente se calculan los datos de la concentración de las muestras utilizando la curva patrón.

3.2.8 Estudios de proteómica

3.2.8.1 Electroforesis monodimensional (1D-SDS-PAGE)

El estudio proteómico de la vía de señalización del receptor GPVI se basó en 1D-SDS-PAGE. Partiendo de las muestras inmunoprecipitadas y lisadas en tampón de Laemmli se realizaron pools de inmunoprecipitaciones y se corrieron en un gel de poliacrilamida en gradiente del 4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) de 8x8 cm. Tras la electroforesis se fijó el gel en una solución de 10% metanol y 7% ácido acético durante 1 hora, se tiñó toda la noche con el colorante fluorescente Sypro Ruby (Lonza Group, Basilea, Suiza) y se lavó finalmente con la solución de 10% metanol y 7% ácido acético durante 30 min. El escaneado del gel se realizó con el Gel Doc XR de Bio-Rad. Las bandas de interés fueron recortadas del gel con ayuda de un transiluminador de luz azul DR-45M (Clare, Chemical Research, Dolores, CO, EEUU) y digeridas con tripsina como se explicará más adelante.

3.2.8.2 Electroforesis bidimensional 2D-DIGE

Esta tesis incluye dos estudios proteómicos basados en 2D-DIGE:

i) Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST.
ii) Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo.

Como los fluoróforos son fotosensibles, todos los pasos que conforman un ensayo 2D-DIGE deben ser realizados en oscuridad.

- **Marcaje fluorescente**

El análisis 2D-DIGE se inició con el marcaje de las muestras utilizando fluoróforos de marcaje mínimo que se unen a los residuos lisina de las proteínas. Independientemente del estudio, en cada uno de los geles se cargó un total de 150 µg de proteína, de los que 50 µg procedían de cada una de las condiciones a comparar y los otros 50 µg correspondían al estándar interno compuesto por una mezcla a partes iguales de todas las muestras incluidas en el análisis. El protocolo de marcaje se describe a continuación:

- Utilizando tiras indicadoras de pH se comprueba que el pH de las muestras se encuentre en torno a 8-8,5.
- Se reconstituyen los tres fluoróforos en dimetilformamida anhidra (DMF) a una concentración de 1000 pmol/µL. Esta solución es estable durante tres meses a -20ºC.
- Los fluoróforos son nuevamente diluidos hasta una concentración de trabajo de 400 pmol/µL. Esta solución es estable 2 semanas a -20ºC.
- Se marcan 50 µg de cada muestra con 400 pmol de los fluoróforos Cy3 y Cy5, y 50 µg del estándar interno con el tercer fluoróforo, el Cy2. Se dejan reaccionar los marcadores y la muestra durante 30 min en hielo.
- La reacción se para añadiendo 1 µL de lisina 10 mM a cada muestra y se deja reposar en hielo durante 10 min.
- A continuación se juntan las tres muestras marcadas en un mismo tubo y se añade el mismo volumen de tampón de muestra 2X. Se mezcla en el agitador de vórtice y se deja reposar de nuevo durante 15 min en hielo.
- Se añaden anfolitos a una concentración final 1,6% (v/v) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) y tampón de muestra 2-DE hasta un volumen final de 500 µL.
- Finalmente se homogeneiza la muestra en un agitador de vórtice durante 2 min y se centrifuga durante 5 min a 10000 g para eliminar los posibles contaminantes.

- **Rehidratación**

Las tiras IPG se rehidrataron pasivamente durante 14-16 h con las muestras ya marcadas, utilizando tiras de gradiente de pH 4-7 de 24 cm (GE Healthcare). El proceso de rehidratación se explica a continuación:

- Se pipetea cada muestra en un carril de la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) y se coloca encima la tira con el gel en contacto con la muestra.
- Finalmente se cubre todo con aceite mineral DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) para evitar evaporaciones.

- **Primera dimensión o isoelectroenfoque**

El siguiente paso, el isoelectroenfoque (*isoelectric focusing*, IEF), se realizó en el Multiphor II (GE Healthcare) a 17ºC como se explica a continuación:

- Tras rehidratar las tiras IPG se elimina el exceso de aceite dejándolo escurrir sobre un papel de filtro y a continuación se colocan en el Multiphor II con el gel hacia arriba.
- Se colocan pequeñas tiras de papel de electrodo humedecidas con agua milliQ en los dos extremos de cada tira IPG con el fin de absorber posibles sales presentes en la muestra y se cubren las tiras con aceite mineral.
- Se colocan los electrodos en la posición adecuada y se procede con el isoelectroenfoque.

Programa para la primera dimensión de 2D-DIGE (64,4kVhT):

- Fase 1: 150 V en gradiente, 3 mA, 5 W, 2 h
- Fase 2: 300 V en gradiente, 10 mA, 5 W, 2 h
- Fase 3: 1000 V en gradiente, 10 mA, 5 W, 1 h
- Fase 4: 3500 V en gradiente, 10 mA, 5 W, 18 h

- **Equilibrado**

Antes de realizar la segunda dimensión se trataron las muestras con tampón de equilibrado 2D-DIGE. En este paso el SDS confiere a las proteínas una distribución de cargas negativa acorde con su tamaño, lo que permitió su separación por peso molecular en la segunda dimensión. El protocolo de equilibrado utilizado fue el siguiente:

- Se colocan las tiras de nuevo en la bandeja de rehidratación y se incuban durante 15 min en agitación con el tampón de equilibrado 2D-DIGE suplementado con DTT 2% (p/v) que sirve para mantener a las proteínas en estado desnaturalizado.
- Se pasan las tiras a un nuevo carril de la bandeja de rehidratación y se incuban durante otros 15 min en agitación con el tampón de equilibrado 2D-DIGE suplementado con iodoacetamida 2,5% (p/v). Este compuesto protege a los grupos sulfhidrilo de reoxidaciones para su mejor identificación por espectrometría de masas.
- Para finalizar se lavan las tiras IPG con abundante agua destilada.

- **Segunda dimensión o SDS-PAGE**

La segunda fase se realizó en geles de poliacrilamida al 11% de 25x20 cm, en el sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare) a 10ºC. Los geles se prepararon el día anterior en el sistema de polimerización DALTsix Gel Caster (GE Healthcare) utilizando como agente reticulante la bis-acrilamida (37,5:1, 30% (p/v)) en presencia del iniciador de reacción N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) y el catalizador persulfato de amonio (*ammonium persulfate*, APS). Se dejaron polimerizar durante 5 horas a temperatura ambiente y se refrigeraron toda la noche cubiertos con solución de almacenamiento para evitar su deshidratación. Para preparar 6 geles de bisacrilamida al 11% se necesitaron 165 mL de bis-acrilamida (37,5:1 30% (p/v)), 113 mL de Tris pH 8,8 1,5M, 4,50 mL de SDS 10% filtrado, 164,57 mL de agua milliQ, 1,80 mL de APS al 10%, y 1,13 mL de TEMED al 10%.
El procedimiento empleado para realizar la segunda dimensión fue el siguiente:

- Se coloca en la parte superior de los geles una solución de agarosa al 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis.
- Se embeben las tiras IPG en la solución de agarosa evitando que queden burbujas.
- Una vez colocadas las tiras se montan los geles en el sistema Ettan DALTsix que se rellena con tampón de electroforesis, y se corre la segunda dimensión en las condiciones adecuadas durante 4-5 h.

Programa para la segunda dimensión 2D-DIGE:

- Fase 1: 80 V, 20 mA/gel, 2 W/gel, 1 h
- Fase 2: 500 V, 40 mA/gel, 17 W/gel (máximo de 100 W), 6 h máximo

- **Obtención de imágenes**

Los geles fueron escaneados inmediatamente después de que finalizase la segunda dimensión y se obtuvieron tres imágenes de cada gel correspondientes a las emisiones de cada uno de los fluoróforos con una resolución de 100 µm. Se utilizaron dos escáneres de fluorescencia según el estudio: FLA 7000 (GE HEalthcare) y Typhoon 9410 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Las condiciones de escaneado fueron las siguientes:

- Cy2 488 nm / 520 BP 40, sensibilidad normal, fotomultiplicador 600V.
- Cy3 532 nm / 580 BP 30, sensibilidad normal, fotomultiplicador 600V.
- Cy5 633 nm / 670 BP 30, sensibilidad normal, fotomultiplicador 600V.

- **Análisis de imagen diferencial**

Tras el escaneado se importaron las imágenes en el programa de análisis de imagen Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics Ltd. Newcastle, Reino Unido) versión 4.5, y se procesaron con el fin de encontrar diferencias reales entre las dos condiciones de estudio. En la Figura 14 se esquematiza el proceso de análisis de imagen con este programa.

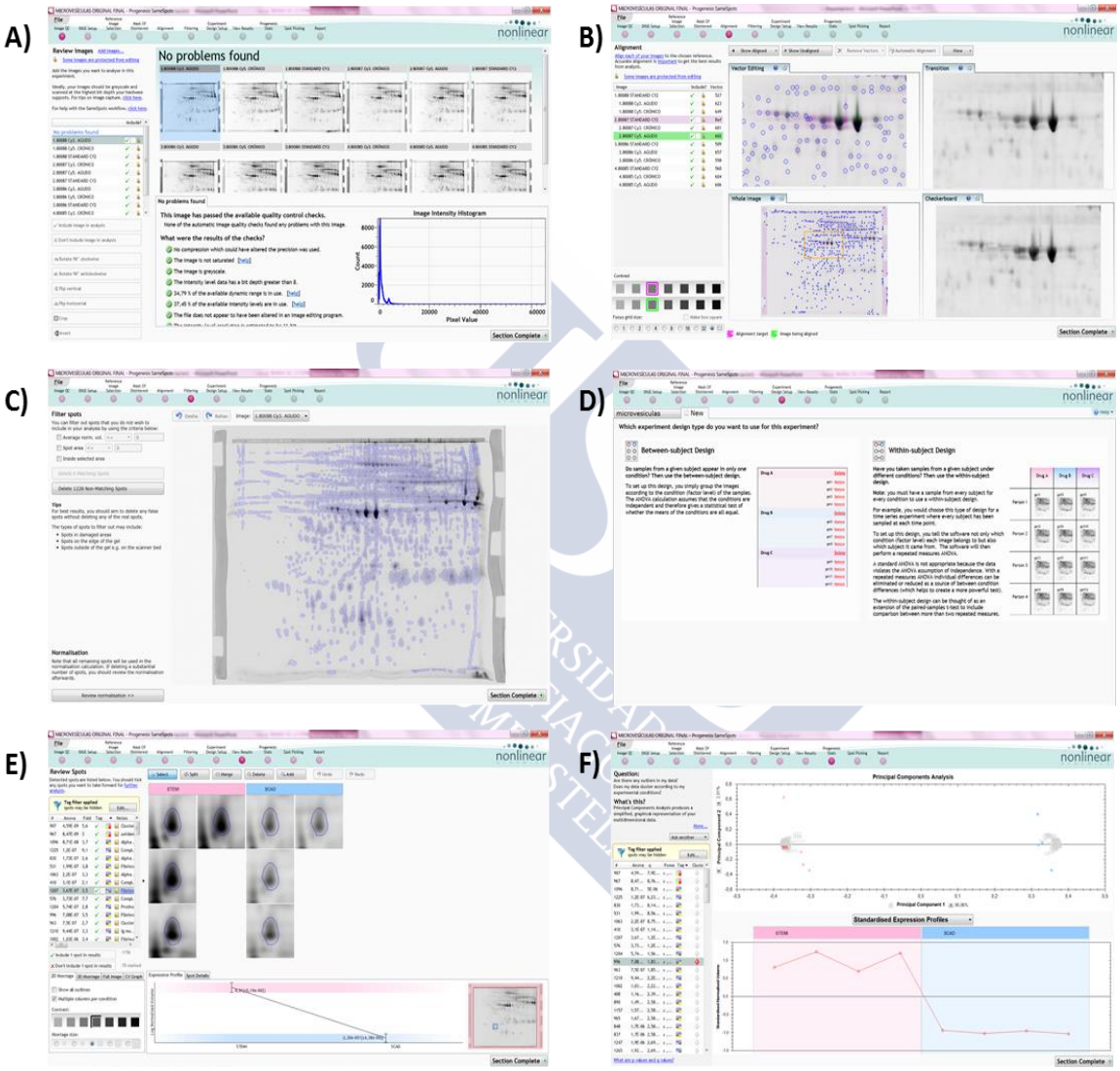


Figura 14 – Proceso de análisis de imagen con SameSpots v4.5. *(A) Chequeo de imágenes. (B) Alineamiento de imágenes. (C) Delimitación de la zona de interés. (D) Diseño del experimento. (E) Visualización de resultados y estadística. (F) Estadística avanzada, perfiles de expresión y análisis de componentes principales.*

Se seleccionaron las imágenes correspondientes a cada gel DIGE y se realizó un control de calidad de las mismas con el fin de evitar saturaciones o distorsiones importantes. A continuación se seleccionó una imagen de referencia con una buena definición de manchas y ausencia de distorsiones, con la que se alinearon el resto de imágenes. Para el emparejamiento de manchas proteicas entre geles se utilizó tanto alineación manual de las imágenes como automática. Una vez alineadas todas las imágenes, SameSpots creó un patrón de manchas consenso que aplicó de manera idéntica a todos los geles evitando así la perdida de información. Se seleccionaron entonces los grupos de imágenes que correspondían a cada condición de estudio y las manchas a incluir en el análisis. El *software* nos permitió realizar una calibración interna del punto isoeléctrico y masa molecular para obtener datos experimentales de las manchas proteicas. Tras comparar todos los geles entre sí se realizó el análisis estadístico ANOVA que condujo a la detección de manchas diferencialmente significativas. Se consideró una mancha como diferencialmente significativa cuando presentaba una variación ≥2 y un $p<0,05$ en el estudio de microvesículas, y una variación ≥1,2 y un $p<0,05$ en el estudio de intracoronaria.

- **Tinción de los geles y escisión de las proteínas de interés**

Tras el análisis de imagen se obtuvieron una serie de manchas proteicas con expresión diferencial entre los grupos a comparar. Para poder visualizar las manchas y cortarlas se tiñeron un par de geles del análisis DIGE con SYPRO Ruby (Lonza). La tinción se realizó en cubetas de tamaño adecuado y con agitación orbital durante todo el proceso, como se explica a continuación:

- Se extraen los geles de los cristales de DIGE y se sumergen en 300 mL de agua destilada durante 10 min para eliminar los posibles restos de tampones y SDS.
- A continuación se sumergen los geles en 300 mL de solución de fijación durante 1 h.
- Se procede a la tinción utilizando 300 mL de SYPRO Ruby fresco por gel y se protegen de la luz por ser una tinción fotosensible. Los geles se dejan tiñendo toda la noche.
- Al día siguiente se lavan los geles con 300 mL de solución de fijación durante menos de 1 h, y finalmente durante 10 min en agua destilada.

Las manchas seleccionadas fueron escindidas de los geles para su posterior análisis por espectrometría de masas. La escisión se realizó en un transiluminador de luz azul DR-45M (Clare Chemical Research, Dolores, CO, EEUU). Algunas de las manchas proteicas fueron difíciles de visualizar para su escisión, mientras que otras, aunque se pudiesen visualizar y cortar, tenían una cantidad de proteína tan baja que no fue posible su identificación. Para

solventar ambas situaciones, se realizaron geles semipreparativos, es decir, geles con mayor cantidad de proteína que la utilizada en el DIGE. Estos geles fueron del mismo porcentaje de bis-acrilamida y se corrieron en las mismas condiciones que los geles DIGE con la salvedad de que contenían 300 µg de proteína (150 µg de cada condición a comparar), y una vez finalizada la segunda dimensión se tiñeron directamente con SYPRO Ruby.

3.2.8.3 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La digestión manual de las muestras procedentes de geles 1D y 2D se realizó con tripsina utilizando el protocolo de Shevchenko[319] con pequeñas modificaciones. Cada mancha proteica o banda se introdujo en un tubo con 20 µL de agua ultra pura para evitar su deshidratación y se realizó el siguiente proceso de digestión:

- Se realizan tres lavados con 100 µL de bicarbonato amónico 50 mM en 50% de metanol (grado HPLC, Scharlau).
- Se reducen las proteínas con DTT 10 mM (SERVA Electrophoresis GmbH) durante 30 min a 56ºC
- Se lavan de nuevo con bicarbonato amónico por triplicado, se deshidratan con acetonitrilo y se secan en un *SpeedVac* (Thermo Scientific).
- Las muestras se alquilan con IAA 55 mM (Sigma-Aldrich) durante 20 min en oscuridad.
- Tras la alquilación se realizan nuevamente tres lavados de las muestras con bicarbonato amónico, se deshidratan con acetonitrilo y se secan de nuevo en el *SpeedVac*.
- Se añade tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WY EEUU) a una concentración final de 20 ng/mL en bicarbonato amónico 20 mM, y se incuban durante toda la noche a 37ºC.
- Se extraen los péptidos del gel utilizando 40 µL de una solución al 60% de acetonitrilo y 0,5% de ácido fórmico. Este punto se realiza por triplicado. Finalmente se secan en el *SpeedVac* y se guardan a -20ºC.

La identificación de las proteínas presentes se realizó en el Servicio de Proteómica de la Fundación Ramón Dominguez (Hospital Clínico Universitario de Santiago) utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF o en el Servicio de Espectrometría de Masas y Proteómica de la *Universidade de Santiago de Compostela* utilizando un sistema nano-LC acoplado a un espectrómetro con analizador tipo trampa iónica.

i) Identificaciones mediante MALDI-TOF/TOF y MALDI-MS/MS

Las manchas proteicas más intensas procedentes de los geles 2D-DIGE se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 (ABSciex, Framingham, MA, EEUU). El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Se disuelven los péptidos concentrados en 4 µL de una solución al 20% de acetonitrilo y 0,5% de ácido fórmico.
- En una placa MALDI 384 Opti-TOF (ABSciex) se depositan 0,5 µL de los péptidos disueltos en la solución anterior y se dejan secar al aire. Una vez secos se deposita encima 0,5 µL de solución de matríz (3 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en una solución al 50% de acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluroacético), lo que se conoce como método de la capa fina (*thin layer method*).
- Se analizan los espectros usando 4000 Series Explorer Software v3.5 (Applied Biosystems) y se combinan los espectro de huella peptídica y de los espectros de MS/MS (máximo ocho precursores) con el GPS Explorer Software v3.6 (Global Proteome Server, ABSciex) o ProteinPilot Software v4.5 (Applied Biosystems), realizando la búsqueda con el programa MASCOT en bases de datos no redundantes del Swissprot

Los espectros de masas MALDI-TOF/TOF se obtuvieron en modo reflector positivo con un láser Nd:YAG. La longitud de onda utilizada fue de 355 nm y la frecuencia del láser 200 Hz. Se realizaron entre 1000 y 2000 disparos con, al menos, tres picos de autolisis de tripsina como calibración interna (picos de autolisis m/z=842,510 y m/z=2211,105). Los espectros de MALDI-MS/MS se realizaron después de la selección de los precursores con una resolución relativa de 300 (*full width at half maximum*, FWHM) y supresión de metastables. La calibración interna de los espectros de MALDI-MS/MS se realizó utilizando los espectros de iones fragmentados de Glub-fibrinopéptido (4700 Cal Mix, Applied Biosystems).

La búsqueda en bases de datos se realizó con Mascot v2.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) como motor de búsqueda y para la identificación de las proteínas se consultó la base de datos UniProt/SwissProt.[235] Las búsquedas fueron restringidas a taxonomía humana permitiendo como modificación fija la carbamidometil cisteína y como potencial modificación variable la metionina oxidada. Se estableció como límite de tolerancia 50 ppm para el precursor y 0,35 Da para MS/MS, permitiendo un único fallo en la fragmentación tríptica. Los valores obtenidos para proteínas con puntuaciones superiores a 56 fueron consideradas como significativos ($p<0,05$), considerándose positiva la identificación

cuando el coeficiente de intervalo se encuentra por encima del 99%. En el caso de los MS/MS el porcentaje de confianza aceptado fue por encima del 95%

ii) Identificaciones mediante LC-MS/MS

Las manchas proteicas menos intensas, aquellas que no se habían podido identificar por MALDI-TOF/TOF y las bandas escindidas del gel monodimensional, se analizaron mediante LC-MS/MS de la siguiente manera:

- Las mezclas peptídicas concentradas se disuelven en una solución de ácido fórmico al 0,1% y se separan conforme a la hidrofobicidad de los péptidos utilizando el sistema EASY-nLC (Proxeon, Bruker Daltonik GmbH) con una nanocolumna de fase reversa (EASY-Column SC200 C18, 3 µm, 120A, 360 µm, OD/75 µm ID, L 10 cm) de Proxeon.
- Una vez ionizados los péptidos se analizan automáticamente en un espectrómetro de trampa iónica Bruker amaZon ETD, utilizando Data Analysis v4.0 y BioTools v3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Billerica, MA, EEUU).
- Se procede a la búsqueda en la base de datos UniProt,[235] utilizando el motor de búsqueda Mascot v2.4 (Matrix Science, London, Reino Unido).

Las búsquedas se restringieron a taxonomía humana permitiendo las mismas modificaciones que en el caso del MALDI. La tolerancia de la masa del precursor y la de MS/MS se fijaron en 0,3 y 0,4 Da, respectivamente, permitiendo un fallo en la fragmentación tríptica. Los espectros y los resultados obtenidos de las bases de datos se inspeccionaron manualmente con el software mencionado, especialmente en el caso de las identificaciones basadas en un solo péptido. En el caso de la identificaciones basadas en un único péptido, solo fueron consideradas validas cuando se obtenían más del 50% de los iones "*y*" para el péptido y si además dicho péptido tenía al menos ocho aminoácidos y no presentaba fallo de fragmentación tríptica. Además de los requisitos mencionados, se estableció como punto de corte valores de Score de Mascot superiores a 40 en todos los casos.

3.2.9 Estudios de validación

Para realizar las validaciones de las proteínas de interés se realizaron inmunodetecciones o inmunoprecipitaciones seguidas de inmunodetecciones, en función del estudio.

3.2.9.1 Inmunoprecipitaciones

Para las validaciones del estudio de la vía de señalización de GPVI se realizaron inmunoprecipitaciones de las proteínas fosforiladas en tirosina, seguidas por inmunodetecciones de las proteínas de interés. Las inmunoprecipitaciones se realizaron como se describe en el apartado 3.2.5 de esta sección, con la diferencia de que en este caso se añadieron 5 µg del anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 conjugado a agarosa (Millipore) a cada inmunoprecipitación. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron en 30 µL de tampón Laemmli 2X y se procedió con las inmunodetecciones.

3.2.9.2 Inmunodetecciones

Las validaciones por inmunodetección se realizaron en geles de 8x8 cm. Los geles empleados fueron de poliacrilamida al 10% o geles comerciales en gradiente 4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). En función del estudio se realizaron geles mono o bidimensionales y se utilizaron marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad).

i) Inmunodetección en geles monodimensionales

Para las inmunodetecciones por 1D se suplementó el volumen necesario de muestra (según el experimento) con el mismo volumen de tampón Laemmli 2X y se completó con tampón Laemmli 1X hasta 40 µL. Los geles se corrieron en el sistema XCell SureLock (Invitrogen) utilizando tampón de electroforesis en el caso de los geles hechos a mano, y tampón de electroforesis comercial MOPS (Invitrogen) para los geles comerciales. La electroforesis se realizó a 80 V durante 10 min para que las proteínas penetrasen lentamente en el gel, y a continuación a 120 V hasta que el frente llegase al final del gel.

ii) Inmunodetección en geles bidimensionales

En los estudios de MVs e intracoronaria algunas de las validaciones se realizaron mediante inmunodetección tras una electroforesis bidimensional. El protocolo utilizado fue el mismo que se explicó en el apartado del 2D-DIGE (3.2.8.2), con algunas excepciones: se utilizan tiras de 7 cm y pH 4-7 para el IEF, y el volumen necesario (según el experimento) de la

muestra disuelta en tampón de 2D-DIGE se suplementa con el mismo volumen de tampón de muestra 2X, anfolitos (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) a una concentración final de 1,6% (v/v) y tampón de muestra 2-DE hasta un volumen final de 125 µL.

Programa utilizado para la primera dimensión en geles pequeños:

- Fase 1: 200 V, 3 mA, 5 W, 1 min
- Fase 2: 3500 V, 10 mA, 5 W, 1 h 30 min
- Fase 3: 3500 V, 10 mA, 5 W, 1 h 40 min

La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 10% de 8x8 cm, y se corrió en el sistema XCell SureLock (Invitrogen) utilizando tampón de electroforesis. La electroforesis se realizó a 80 V durante 10 min y posteriormente a 120 V hasta que el frente llegase al final del gel.

Una vez resueltas las proteínas en geles mono o bidimensionales se procedió a su transferencia a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando un sistema húmedo y siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- Tras extraer cuidadosamente los geles de sus carcasas se depositan en una cubeta con tampón de transferencia durante 5 min para eliminar los restos del tampón de electroforesis.
- Se monta el sándwich de transferencia utilizando esponjas para engrosar el sistema de transferencia y papeles de filtro para separar los geles y las membranas de las esponjas. Sobre cada gel se deposita una membrana de PVDF de su mismo tamaño, previamente hidratada.
- Se realiza la transferencia en el sistema XCell SureLock (Invitrogen) a 200 mA constantes durante 2 h.

Finalizada la transferencia se procedió con las incubaciones y lavados como se detalla a continuación:

- Tras lavar las membranas en TBS-T durante 5 min, se bloquean en solución de bloqueo toda la noche a 4ºC.
- Al día siguiente se incuban las membranas con los anticuerpos de interés a una concentración y durante un tiempo óptimos, determinados experimentalmente. La

incubación y todos los pasos siguientes se realizan a temperatura ambiente y en agitación constante.

- Se realizan tres lavados de 10 min con TBS-T. Se añade el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano y se incuba durante 1 h.
    - Se realizan nuevamente tres lavados de 10 min en TBS-T para eliminar todo el anticuerpo secundario que no esté unido al primario.

Finalmente se procedió con el revelado utilizando Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), Hypercassete (GE Healthcare), placas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) y líquidos de revelado de Ilford (Harman technology LTD, Alemania).

Ocasionalmente se realizaron estripados de las membranas para poder incubarlas de nuevo con otro anticuerpo. Para ello se sumergieron las membranas en solución de retirada de anticuerpos durante 30 min a 50ºC (en baño térmico), se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-T y se volvieron a bloquear en solución de bloqueo toda la noche a 4ºC.

En la Tabla 4 se presenta una relación de todos los anticuerpos empleados durante la realización de la presente tesis doctoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunoprecipitaciones e inmunodetecciones.

Anticuerpos Primarios	***Casa Comercial***	***Referencia***	***Modo de empleo****	***Clase***
4G10 (pTyr)	Millipore	05-321	ID: 1:1000 / 90 min	IgG_{2bk} Ratón Mc
4G10 - Conjugado a agarosa	Millipore	16-101	IP: 10 µg/IP (Proteómica) 5 µg/IP (ID)	IgG Ratón Mc
Actina	Millipore	MAB1501	ID: 1:1000 / 60 min	$IgG_{1κ}$ Ratón Mc
A2MG	Santa Cruz	sc-69750	ID: 1:1000 / 90 min	IgG_1 Ratón Mc
Dok-2	Santa Cruz	sc-13952	ID: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
Fibrinógeno	Santa Cruz	sc-69775	ID: 1:1000 / 90 min	IgG_1 Ratón Mc
G6f	CovalAb UK	[14]	ID: 1:1000 / 90 min	IgG Conejo Pc
GAPDH	Ambion	AM4300	ID: 1:200 / 60 min	IgG_1 Ratón Mc
ITA2B	Santa Cruz	sc-15328	ID: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
MMRN1	Santa Cruz	sc-104426	ID:1:500 / 90min	IgG Cabra Pc
PLCγ2	Santa Cruz	sc-5283	ID: 1:500 / 90min	IgG_1 Ratón Mc
RSAD2/Viperin	Santa Cruz	sc-102099	ID: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
SKAP2	Abcam	ab96274	ID: 1:500 / 120 min	IgG Conejo Pc
SLP76	Santa Cruz	sc-9062	ID: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
TLN1	Santa Cruz	sc-15336	ID: 1:1000 / 60 min	IgG Conejo Pc
TSP1	Santa Cruz	sc-73158	ID: 1:200 / 90 min	IgG_1 Ratón Mc
Anticuerpos Secundarios				
IgG anti-cabra	Santa Cruz	sc-2020	ID: 1:5000 / 60 min	IgG Burro Pc
IgG anti-conejo	Thermo Scientific	31460	ID: 1:5000 / 60 min	IgG Cabra Pc
IgG anti-ratón	Thermo Scientific	31430	ID: 1:5000 / 60 min	IgG Cabra Pc

*IP: inmunoprecipitación; ID: inmunodetección; Mc: monoclonal; Pc: policlonal.

3.2.10 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 para Windows (IBM, NY, EEUU) y las gráficas con el GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego California, EEUU). Los datos clínicos de los pacientes se expresan en porcentajes cuando se trata de variables categóricas y se compararon utilizando el test exacto de Fisher. En el caso de las variables continuas se utilizó el test exacto U de Mann-Withnney, y se expresan como la media seguida de la desviación estándar. En los estudios proteómicos se utilizó el estadístico ANOVA para calcular el valor p en cada una de las manchas proteicas utilizando los

volúmenes cuantificados y normalizados de cada una de las imágenes del análisis. Los valores de probabilidad empleados fueron en todos los casos de dos colas, considerando estadísticamente significativos aquellos con un $p<0,05$. Para los estudios de validación se realizaron densitometrías de las manchas proteicas o de las bandas utilizando el software ImageMeter versión1.1 (Flashcript). La comparación estadística de los grupos incluidos en cada estudio se realizó empleando el test exacto U de Mann-Whithnney o el test de Wilcoxon matched-pairs signed rank test, según correspondiese.

3.2.11 Análisis de biología de sistemas

Con el fin de explorar las relaciones existentes entre las proteínas diferencialmente expresadas se utilizó Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, Redwood Cyty, CA, EEUU). Se empleó el módulo de exploración de redes que genera información de las diferentes redes de interacción en las que están implicadas las proteínas, así como las principales funciones en las que éstas están involucradas. De este modo se introdujo en cada estudio la lista de proteínas diferenciales encontradas y se analizaron utilizando los siguientes parámetros:

- Ingenuity Knowledge Base (Genes Only) como base de datos de referencia.
- Relaciones directas e indirectas entre las proteínas.
- 25 redes por análisis.
- 140 moléculas por red.
- Todas las fuentes de datos disponibles.
- Todos los tejidos y líneas celulares.
- Solo los datos validados experimentalmente son de confianza.
- Datos restringidos a la especie humana.

Este programa generó información sobre las principales rutas canónicas en las que tienen protagonismo las proteínas detectadas como diferenciales, así como de aquellas patologías en las que están involucradas.

3.2.12 Estudios para caracterización de MVs

i) Caracterización de las MVs mediante citometría de flujo

Uno de los métodos empleados para la caracterización de las MVs tras su aislamiento fue la citometría de flujo (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Tras la segunda ultracentrifugación realizada durante el proceso de extracción de MVs (ver sección 3.2.6) se separó una alícuota de MVs disueltas en KBr 0,25 M y se procedió como se indica a continuación:

- Se incuba la alícuota de MVs con anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD41 conjugado con FITC (DakoCytomation F7088) durante 30 min a 4ºC y en oscuridad.
- Se utiliza un isotipo control (BD Biosciences) con el fin de descartar la posible unión inespecífica del anticuerpo.
- Se añaden 3 gotas / mL de bolitas de entre 1 y 1,4 µm (Spherotech Inc., Lake Forest, IL, EEUU) para estimar el tamaño de las MVs.

Para el análisis FACS, el umbral del parámetro que determina el tamaño de las partículas (*Forward Scatter,* FSC) fue eliminado y el umbral del parámetro que determina la complejidad de las mismas (*Side Scatter,* SSC) se colocó en 300. La adquisición de los parámetros FSC y SSC se realizó en escala logarítmica, debido al reducido tamaño de las MVs. Para cada muestra se realizaron 30000 eventos de adquisición dentro de la región CD41+. El análisis se realizó en un citómetro de flujo BD FACS CANTO II, utilizando el software FACS Diva Version 6.1.2.

ii) Caracterización de las MVs mediante microscopía electrónica de transmisión

Del mismo modo, se realizó un análisis de microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM) para caracterizar las MVs plasmáticas aisladas. Se utilizaron muestras frescas de MVs obtenidas tras la segunda ultracentrifugación del proceso de extracción de (ver sección 3.2.6). Se recogió el sedimento de MVs diluído en 100 µL de PBS estéril y se colocaron 10 µL en una rejilla de cobre cubierta con una membrana Formvar. La muestra se tiñó con ácido fosfotúngstico con el fin de aumentar el contraste y una vez seca se introdujo en el microscopio electrónico de transmisión PHILIPS CM-12 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) donde se analizó a 100 kV.

iii) Estimación de la distribución de las subpoblaciones de MVs mediante dispersión dinámica de luz

Con el fin de estimar la distribución de los tamaños de partículas en suspensión presentes en la muestra se recurrió a la técnica de dispersión dinámica de luz (d*ynamic light scatterin*, DLS) utilizando un Nanosizer ZS (Malvern). Este dispositivo tiene en cuenta la variación en la intensidad de dispersión de luz que producen las partículas en el tiempo. En este caso se realizó el procedimeinto completo de aislamiento de MVs y se resuspendieron finalmente en PBS 1X. Para este análisis se utilizó una dilución 1:10 de la concentración original de MVs. El área bajo cada pico se integró para producir una estimación del porcentaje de volumen de cada población de vesículas.

3.2.13 Búsqueda de pequeños inhibidores de GPVI

Estudios basados en técnicas de cribado de alto rendimeinto

Para la búsqueda de pequeños inhibidores del receptor de colágeno GPVI se realizó un estudio piloto basado en técnicas de cribado de alto rendimiento (o *high-thoughput screening,* HTS). Como medida indirecta del nivel de activación plaquetaria se evaluaron los niveles de Ca^{2+} intracelular utilizando el kit comercial Calcium 4 (Molecular Devices).

Antes de comenzar con el ensayo de HTS se prepararon las diluciones intermedias de plaquetas, inhibidores y agonistas plaquetarios de la siguiente manera:

- Tras extraer las plaquetas de la sangre como se explica en el apartado 3.2.2 se prepara una dilución intermedia resuspendiéndolas en una mezcla 1:1 de los buffers MTB y HBSS suplementado. La dilución intermedia se calcula teniendo en cuenta que en 25 µL debe haber 10^7 plaquetas.
- Se prepara la dilución intermedia de inhibidores (integrilina, apirasa e indometacina) en una mezcla 1:1 de los buffers MTB y HBSS suplementado. Esta dilución debe ser cinco veces más concentrada de lo deseado ya que durante el ensayo se añadirán 12,5 µL a un volumen total de 62,5 µL. Las concentraciones finales deseadas son apirasa 2 U/mL, indometacina 10 µM e integrilina 9 µM.
- Se preparan la dilución intermedia de inhibidores + Fab-OM2 en una mezcla 1:1 de los buffers MTB y HBSS suplementado. Esta dilución debe ser cinco veces más concentrada de lo deseado ya que durante el ensayo se añadirán 12,5 µL a un volumen total de 62,5

µL. Las concentraciones finales deseadas de inhibidores son las mismas que en el punto anterior, y la de Fab-OM es de 1 µg/mL.

- Se preparan las diluciones intermedias de los agonistas plaquetarios (CRP, colágeno, trombina y rhodocytin) en una mezcla 1:1 de los buffers MTB y HBSS suplementado. Esta dilución debe ser seis veces más concentrada de lo deseado ya que durante el ensayo se añadirán 12,5 µL a un volumen total de 75 µL. Las concentraciones finales deseadas son CRP 5 µg/mL, CRP 3 µg/mL, CRP 1 µg/mL, CRP 0,5 µg/mL, CRP 0,25 µg/mL, colágeno 30 µg/mL, trombina 0,75 U/mL y rhodocytin 100 nM.

Para realizar los ensayos de HTS se utilizaron placas negras de 384 pocillos de fondo transparente (Greiner Bio-One, Alemania) y se probaron fármacos de la quimioteca de Prestwick. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Se dispensan en los pocillos de las placas de ensayo 25 µL de la dilución intermedia de plaquetas, se añaden 25 µL del kit comercial Calcium 4 y se incuban las plaquetas durante 1 h a 37ºC. Esta placa de ensayo será la placa de trabajo.
- Al mismo tiempo que incuban las plaquetas se preparan dos placas de ensayo, una placa con inhibidores y con los fármacos que se van a probar o DMSO en el caso de los controles (placa de diluciones 1), y otra placa con los agonistas a diferentes concentraciones (placa de diluciones 2).
- Pasado el tiempo de incubación se añaden con el Hamamatsu (Hamamatsu Photonics) 12,5 µL de la placa de diluciones 1 sobre cada pocillo de la placa de trabajo y se registra el efecto de los compuestos junto con los inhibidores.
- Se añaden con el Hamamatsu 12,5 µL de la placa de diluciones 2 a cada pocillo y se registra el efecto de los agonistas durante 15 minutos.

Estudios de simulación computacional

Como enfoque adicional para la búsqueda de pequeños inhibidores del GPVI se está llevando a cabo un análisis de acoplamiento *in silico* utilizando la estructura cristalina conocida de GPVI (PDB 2gi7 ID)[135] y un elevado número de compuestos procedentes de tres quimiotecas diferentes disponibles en el grupo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. Resultados

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1. Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST

4.1.1 Características de pacientes y controles

En el estudio clínico de microvesículas (MVs) del plasma de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST), se recogieron muestras de 25 pacientes agudos (grupo de muestras llamado IAMCEST) y 23 controles con cardiopatía isquémica crónica estable (grupo de muestras llamado CROIAMCEST). Las muestras de los controles fueron seleccionadas de modo que no hubiese diferencias significativas con el grupo de pacientes agudos en las siguientes variables: edad, sexo, tratamiento antiplaquetario, estatinas y diabetes mellitus. Además de la esperada diferencia en tener una historia previa de enfermedad coronaria, el análisis estadístico no reveló la existencia de otras diferencias significativas entre ambos grupos. Las características clínicas básicas de los pacientes y controles incluidos en el estudio se muestran en las Tablas 5 y 7. En los estudios de validación se incluyó además un grupo de donantes sanos.

4.1.2 Caracterización de las microvesículas del plasma

Tras extraer las MVs del plasma, como se indicó en la sección 3.2.6 de material y métodos, se procedió a la caracterización de las mismas mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión con el fin de verificar que habían sido aisladas correctamente y que se encontraban intactas. Los resultados se muestran en la Figura 15.

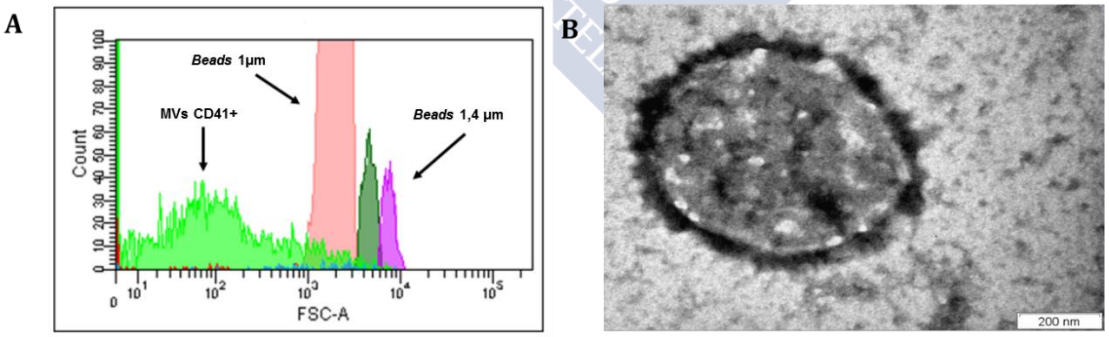


Figura 15. Caracterización de las MVs del plasma. *(A) Caracterización por citometría de flujo. (B) Caracterización por microscopía electrónica de transmisión.*

Así mismo, se realizó un análisis de dispersión dinámica de luz para elucidar la distribución aproximada de las diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares. Los resultados mostrados en la Figura 16 reflejan la presencia de exosomas y cuerpos apoptóticos, además de la población de MVs mayoritaria.

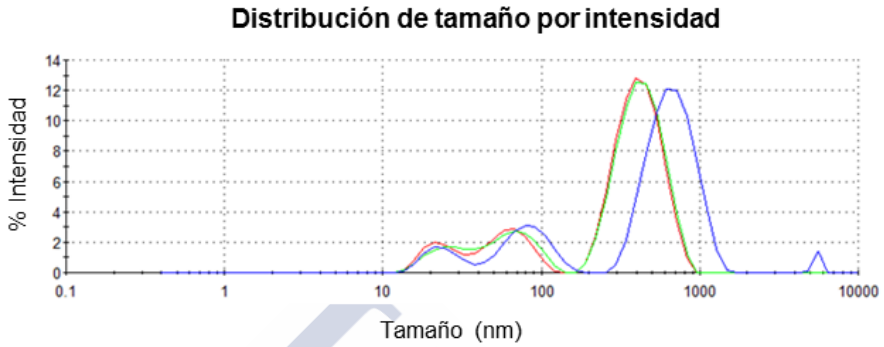


Figura 16. Estimación del porcentaje, en volumen, de cada subpoblación de vesículas extracelulares por dispersión dinámica de luz. *Cada línea representa una estimación independiente.*

4.1.3 Análisis proteómico 2D-DIGE

El estudio proteómico comparativo de las MVs procedentes del plasma de pacientes con IAMCEST y CROIAMCEST se realizó utilizando *pools*, es decir, se corrieron replicas técnicas en ausencia de proteína suficiente para procesar replicas biológicas y técnicas. Cada uno de estos *pools* estaba compuesto por muestras de 10 pacientes (10 IAMCEST y 10 CROIAMCEST) cuyas características clínicas básicas se resumen en la Tabla 5. Para comparar los proteomas de ambos grupos se empleó un total de cuatro geles 2D (réplicas técnicas) de bisacrilamida al 11% y tiras IPG de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7. Los geles fueron digitalizados en un escáner de fluorescencia modelo Typhoon 9410 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). En la Figura 17 se muestra una imagen representativa correspondiente a uno de los geles del estudio proteómico 2D-DIGE.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de MVs. Versión reducida.

Variable	IAMCEST (N=10)	CROIAMCEST (N=10)
Edad (años)	57 ± 14	61 ± 12
Mujeres (%)	30	30
Hx hipertensión arterial (%)	60	40
Hx diabetes mellitus (%)	30	20
Hx dislipidemia (%)	40	60
Hx enfermedad coronaria (%)*	0	100
Plaquetas/ µL	260000 ± 81697,6	243600 ± 79933,6
Tratamientos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 1.*

El análisis de imagen detectó una media de 1228 manchas de proteínas por gel. Los criterios de selección de las diferencias significativas fueron las variaciones de intensidad de las manchas entre grupos ≥2 y valor p<0,05. Aplicando estos criterios, se detectaron un total de 117 diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 18). Setenta y tres de las diferencias se encontraron en mayor cantidad en los geles de pacientes con IAMCEST y 44 en el grupo de controles CROIAMCEST. Todas las diferencias resultaron tener un p<0,01.

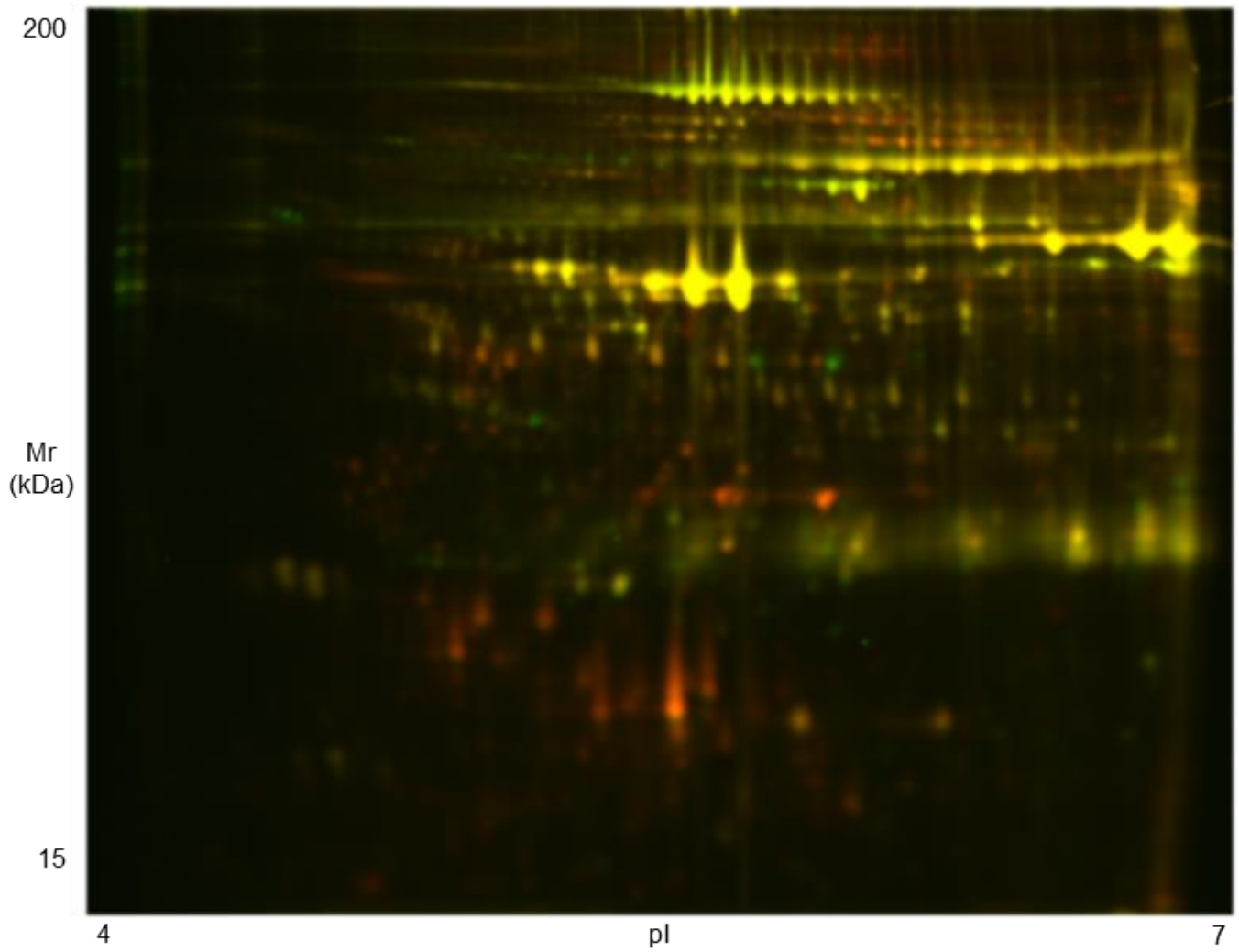


Figura 17. Análisis proteómico de alta resolución 2D-DIGE. Comparativa de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST. Imagen representativa de un análisis 2D-DIGE donde se superpone la emisión de los fluoróforos Cy3 y Cy5. *Las manchas de color rojo están aumentadas en MVs de pacientes con IAMCEST, mientras que las manchas de color verde están disminuidas en dichos pacientes respecto a los controles. Mr, masa molecular relativa; pI, punto isoeléctrico. La imagen en alta resolución se puede consultar en el CD adjunto.*

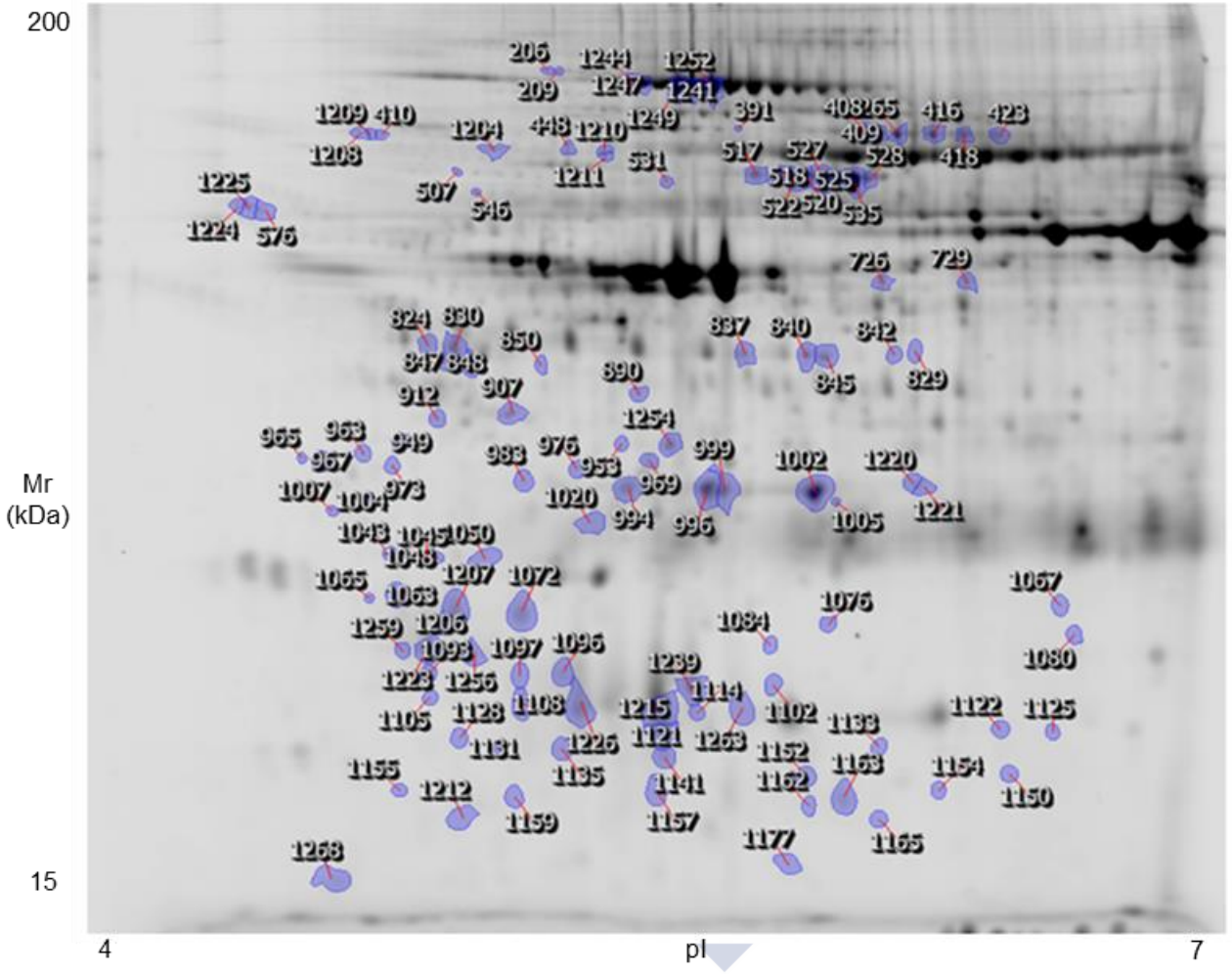


Figura 18. Análisis de imagen diferencial. Comparativa de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST. Imagen representativa del análisis en escala de grises. *Las manchas reguladas diferencialmente entre ambas condiciones de estudio se encuentran marcadas y numeradas. Mr, masa molecular relativa; pI, punto isoeléctrico. La imagen en alta resolución se puede consultar en el CD adjunto.*

4.1.4 Identificación de proteínas

No todas las diferencias detectadas pudieron ser escindidas de los geles 2D-DIGE ni de los geles semipreparativos. De las 117 diferencias encontradas inicialmente, 102 fueron identificadas satisfactoriamente por espectrometría de masas, 61 de las cuales estaban aumentadas en pacientes con IAMCEST y 41 disminuidas. La mayor parte de las manchas fueron identificadas mediante LC-MS/MS, y un pequeño número mediante MALDI-TOF/TOF o MALDI-MS/MS. La identificación indicó que esas 102 manchas proteicas se correspondían con 25 proteínas únicas (*oppen reading frames, ORFs*) (Tabla 6).

Tabla 6. Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de MVs acompañadas de sus identificaciones. Version reducida.

Mancha	Identificación UniProt	Código UniProt	Variación
206	von Willebrand factor	VWF_HUMAN	-2,1
	Fibronectin	FINC_HUMAN	
	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	
209	von Willebrand factor	VWF_HUMAN	-2
391	Complement C1r subcomponent	C1R_HUMAN	2.1
408	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,5
409	No identificada	--	2,1
410	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	-2,1
416	No identificada	--	2,3
418	Alpha 2 macroglobulin[aa]	A2MG_HUMAN	2,1
423	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,3
448	Ig mu chain c region	IGHM_HUMAN	-3,4
507	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	-2,8
517	Serum albumin	ALBU_HUMAN	-3,2
518	Serum albumin	ALBU_HUMAN	-2,2
520	No identificada	--	-2,6
522	Serum albumin[a]	ALBU_HUMAN	-2,6
525	Serum albumin[a]	ALBU_HUMAN	-2,3
527	Serum albumin[a]	ALBU_HUMAN	-2,2
528	Serum albumin	ALBU_HUMAN	-2,2
531	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,8
535	Serum albumin[a]	ALBU_HUMAN	-2,1
546	No identificada	--	-2,7
576	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	-7,7
726	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	2,3
	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	
729	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	2,2

824	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,2
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
829	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	-2,5
830	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,6
837	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	-4
840	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	2,2
842	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	2,2
845	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	-7,7
847	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,1
848	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3
	alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	
850	Fibronectin	FINC_HUMAN	2,1
	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	
890	Haptoglobin	HPT_HUMAN	2,2
907	Clusterin	CLUS_HUMAN	5,6
	Complement C1r subcomponent	C1R_HUMAN	
912	Complement C3	CO3_HUMAN	2,5
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
949	Clusterin	CLUS_HUMAN	2,4
953	Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	2,3
963	Clusterin	CLUS_HUMAN	2,7
965	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,4
967	No identificada	--	3,1
969	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	2,8
973	Clusterin	CLUS_HUMAN	2,4
976	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	2,1
983	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	-2,1
994	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,3
996	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,5
999	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	2,3
	Ig lambda-2 chain C regions	LAC2_HUMAN	
	Ig lambda chain V-IV region Hil	LV403_HUMAN	
1002	Fibrinogen gamma chain[aa]	FIBG_HUMAN	3,4
1004	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,2
1005	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	-2,1
	Ig lambda-2 chain C region	LAC2_HUMAN	
1007	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,4
1020	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	-2
	Fibrinogen beta chain	FIBG_HUMAN	
1043	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	-6,9
1045	No identificada	--	-2,8
1048	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	-3,1
1050	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	-2
1063	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,3
1065	No identificada	--	4,6

1067	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	3,7
1072	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,3
1076	Apolipoprotein A-1	APOA1_HUMAN	-8,8
1080	Fibrinogen beta chain	FIBA_HUMAN	-2,4
1084	Apolipoprotein A-1	APOA1_HUMAN	5,7
1093	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,3
1096	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,7
1097	No identified	--	2,2
1102	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,7
1105	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,3
1108	No identificada	--	3,1
1114	Serum albumin	ALBU_HUMAN	2,9
	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	
	Mannan-binding lectin serine protease 2	MASP2_HUMAN	
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	
	Apolipoprotein A-1	APOA1_HUMAN	
	Haptoglobin	HPT_HUMAN	
1121	Haptoglobin	HPT_HUMAN	3,2
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
1122	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	-2,2
1125	Haptoglobin	HPT_HUMAN	-4,6
1128	No identificada	--	2,7
1131	No identificada	--	2,3
1133	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	-3,2
1135	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,7
1141	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,8
1150	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	2,7
1152	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,2
1154	Complement C3	CO3_HUMAN	2,5
	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	
1155	No identificada	--	2,7
1157	Ig mu chain region	IGHM_HUMAN	2,4
1159	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,6
1162	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	2,8
1163	No identificada	--	2,8
1165	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	-3,8
1177	Haptoglobin	HPT_HUMAN	-2,7
1204	Prothrombin	THRB_HUMAN	-2,8
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN	
1206	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	4,1
1207	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	3,5
1208	Fibronectin	FINC_HUMAN	-2,1
	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	

1209	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	-2,1
1210	Ig mu chain region	IGHM_HUMAN	-3,3
1211	Ig mu chain region	IGHM_HUMAN	-6,7
	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	
1212	No identificada	--	3,1
1215	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,9
1220	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	2,2
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
1221	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	2,8
1223	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,8
	Radical S-adenosil methionine domain-containing protein2 (Viperin) (*)	RSAD2_HUMAN (*)	
1224	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	-8,6
1225	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	-9,1
1226	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	4,9
1239	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	4
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
1241	Alpha 2 macroglobulin[a]	A2MG_HUMAN	-2,2
1244	Alpha 2 macroglobulin[aa]	A2MG_HUMAN	-2,2
1247	Alpha 2 macroglobulin[a]	A2MG_HUMAN	-2,3
1249	Alpha 2 macroglobulin[a]	A2MG_HUMAN	-2,2
1252	Alpha 2 macroglobulin[a]	A2MG_HUMAN	-2,1
1254	CD5 antigen-like	CD5L_HUMAN	2,3
1256	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	3,8
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	
1259	Alpha 2 macroglobulin	A2MG_HUMAN	4,8
1263	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	3,2
1265	Alpha 2 macroglobulin[aa]	A2MG_HUMAN	2,6
1268	No identificada	--	3,9

Una variación positiva indica que la mancha está aumentada en MVs de pacientes con IAMCEST, mientras que una variación negativa indica que la mancha está disminuida en dichos pacientes, con respecto a controles CROIAMCEST. Las identificaciones se realizaron mediante LC-MS/MS, a menos que se indique lo contrario: proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF[a] o MALDI-MS/MS[aa]. La versión extendida de esta tabla se puede consultar en el CD adjunto (Anexo IV, Tabla suplementaria 9).

En líneas generales, la mayor parte de las proteínas identificadas estaban involucradas en respuesta inflamatoria y enfermedad cardiovascular.

4.1.5 Validación de los resultados

Para las validaciones se seleccionó un grupo independiente de pacientes (15 IAMCEST y 13 CROIAMCEST) cuyas características clínicas básicas se muestran en la Tabla 7. Se incluyó además un grupo de 10 donantes sanos macheados por sexo. Las proteínas seleccionadas fueron validadas por inmunodetección 1D y 2D. Las inmunodetecciones por 1D se realizaron en geles de poliacrilamida al 10%, cargando 8 µg de proteína por carril. Las inmunodetecciones por 2D se realizaron para poder visualizar cambios en isoformas debidos a modificaciones postraduccionales y se emplearon tiras de IPG de 7 cm y rango de pH 4-7 (GE Healthcare) para la primera dimensión, y geles en gradiente (4-12%) NuPAGE (Invitrogen) Bis-Tris para la segunda. En este caso se cargaron 40 µg de proteína por gel.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el las validaciones del estudio de MVs. Versión reducida.

Variable	IAMCEST (N=15)	CROIAMCEST (N=13)
Edad (años)	65 ± 16	63 ± 14
Mujeres (%)	30	20
Hx hipertensión arterial (%) *	46,7	92,3
Hx diabetes mellitus (%)	40	20
Hx dislipidemia (%)	55,3	53,8
Hx enfermedad coronaria (%)*	0	100
Plaquetas/ µL	219357 ± 57911,9	225385 ± 51160,8
Tratamientos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 2.*

Del conjunto total de proteínas diferencialmente reguladas se seleccionaron tres para su validación mediante experimentos de inmunodetección mono o bidimensional. Dos de ellas estaban involucradas en trombogénesis (α2-macroglobulina y fibrinógeno-γ) y otra en procesos ateroscleróticos (viperina). Se seleccionaron estas proteínas porque podrían ser buenos marcadores de MVs en IAMCEST.

a) Isoformas de α2-macroglobulina están aumentadas en las MVs del plasma de pacientes con IAMCEST

Alfa-2-macroglobulina (A2MG) es una glicoproteína inhibidora de proteinasas presentes en el plasma humano. El análisis proteómico 2D-DIGE reveló la presencia de A2MG en 31 manchas con expresión diferencial, 23 de las cuales se encontraban aumentadas en las MVs del plasma de pacientes con IAMCEST (ver Tabla 6). Más en detalle, la mayoría de las manchas sobrerreguladas en IAMCEST se correspondían con fragmentos proteolíticos de entre 70 y 110 kDa. Las inmunodetecciones bidimensionales mostraron que esta proteína presenta manchas en la región de 70 a 110 kDa sobreexpresadas en MVs del plasma de pacientes con IAMCEST (Figura 19A), respecto a los controles crónicos y donantes sanos.

b) Fibrinógeno y viperina están aumentadas en las MVs del plasma de pacientes con IAMCEST

El fibrinógeno es una proteína clave para la agregación plaquetaria y la formación de trombos. El análisis proteómico detectó 41 manchas correspondientes a fibrinógeno, siete de las cuales se corresponden con la cadena α, cinco con la cadena β y 29 con la cadena γ (ver Tabla 6). De las 41 manchas correspondientes a fibrinógeno, 31 estaban aumentadas en MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST. Este resultado fue confirmado por inmunodetección monodimensional de la proteína (Figura 19B).

La viperina, también conocida como *Radical S-adenosil methionine domain-containing protein 2* (RSAD2), es una proteína antiviral inducible por virus, capaz de inhibir un amplio rango de virus de ADN y ARN. El análisis proteómico 2D-DIGE detectó la sobrerregulación de una mancha que contiene viperina en las MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST (Tabla 6). El análisis por inmunodetección monodimensional reveló una banda de unos 40 kDa aumentada en los pacientes con IAMCEST respecto de los controles crónicos y los donantes sanos (Figura 19B).

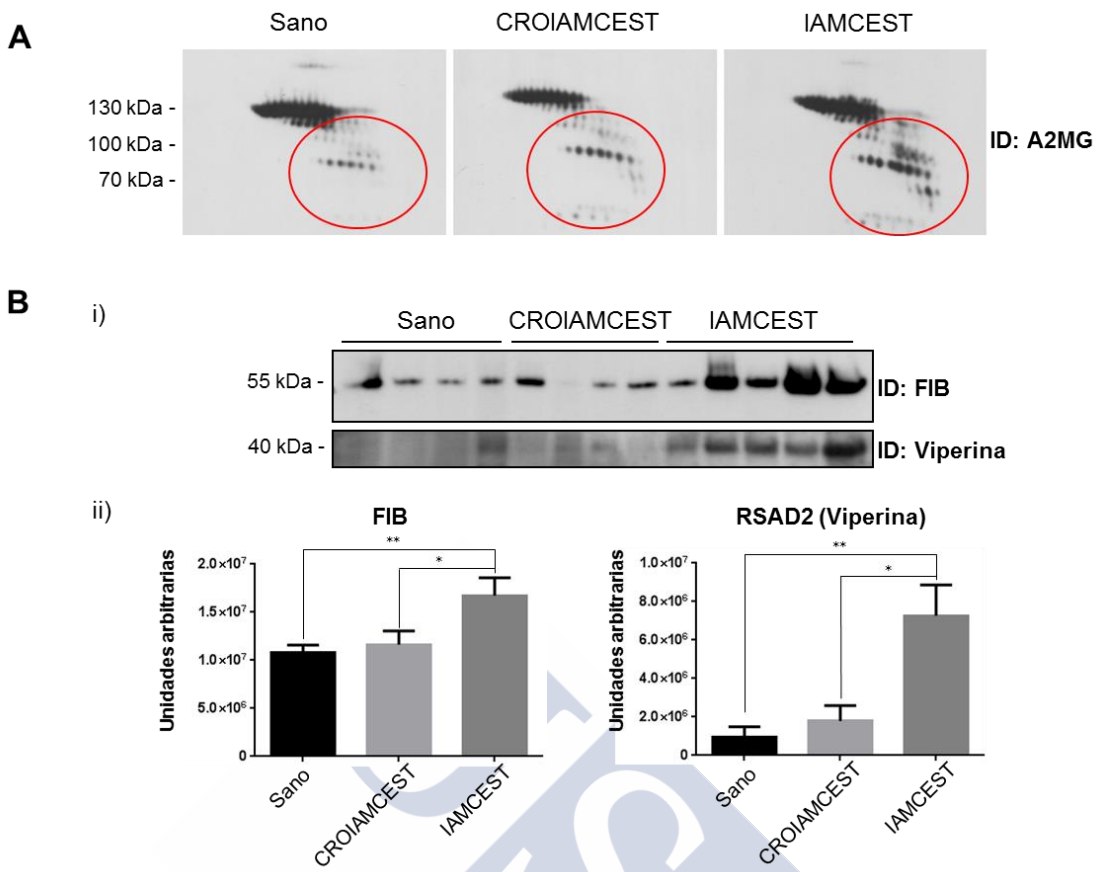


Figura 19. Validaciones por inmunodetección de α2-macroglobulina, fibrinógeno y viperina. Las tres proteínas se encuentran aumentadas en las MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST. *(A) Imágenes de inmunodetecciones 2D de A2MG. Las manchas sobreexpresadas en IAMCEST están rodeadas. (B) (i) Imagen representativa de inmunodetecciónes 1D de FIB y RSAD2. (ii) Gráficos densitométricos que representan los valores medios y el error estándar de las intensidades de las bandas obtenidas por inmunodetección para todos los pacientes incluidos en el estudio de validación. Las diferencias estadísticamente significativas están destacadas* $^{**}p<0,01$; $^{*}p<0,05$. *ID: Inmunodetección.*

4.1.6 Análisis de biología de sistemas

Se realizó un análisis de biología de sistemas para investigar las posibles interacciones directas e indirectas existentes entre las proteínas identificadas. Para ello se utilizó el programa *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity Systems). El análisis identificó que 20 de las 25 proteínas reguladas diferencialmente, estaban interconectadas en una red relacionada con respuesta inmune humoral, respuesta inflamatoria y enfermedad cardiovascular (Figura 20).

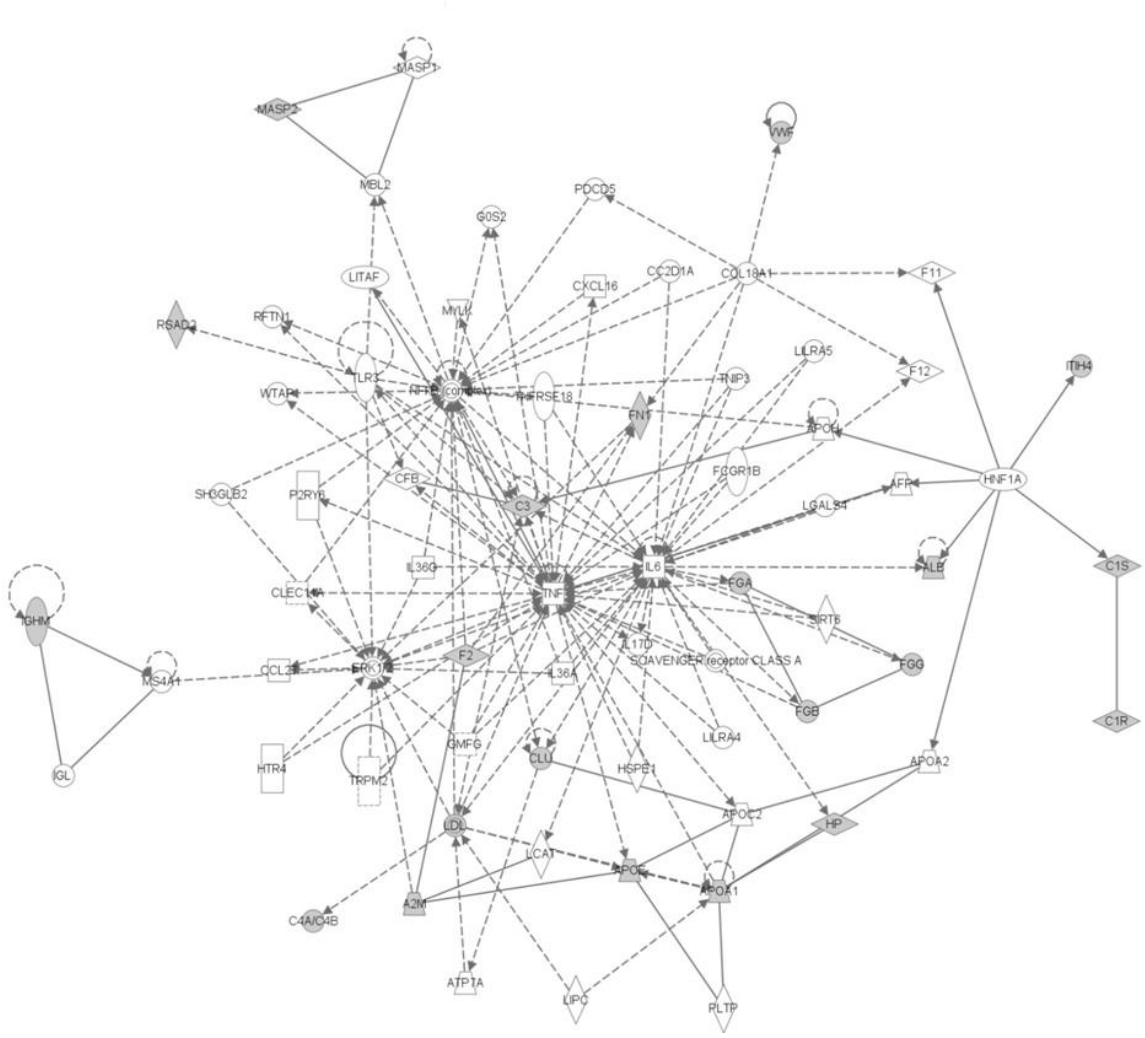


Figura 20. Estudio de MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST: análisis de redes de las proteínas reguladas diferencialmente mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity systems). *La red de interacción representada está relacionada con la respuesta inmune humoral, respuesta inflamatoria y enfermedad cardiovascular, incluyendo 20 de las 25 proteínas identificadas en el análisis proteómico. Las proteínas identificadas en el estudio proteómico diferencial están marcadas como nodos sombreados con el nombre de su gen. Las líneas sólidas representan interacciones directas y las punteadas indirectas. Las flechas de un nodo hacia otro indican que este nodo actúa sobre el segundo. Las líneas sin flecha representan enlaces. Las formas de los nodos significan: doble circulo=complejo o grupo; triangulo=quinasa; forma curvilínea=enzima; circulo=otra.*

La ruta canónica más importante relacionada con las proteínas identificadas es la respuesta de señalización en fase aguda. Curiosamente, 11 de las proteínas están implicadas en infarto (Figura 21A) y 10 están implicadas en aterosclerosis (Figura 21B).

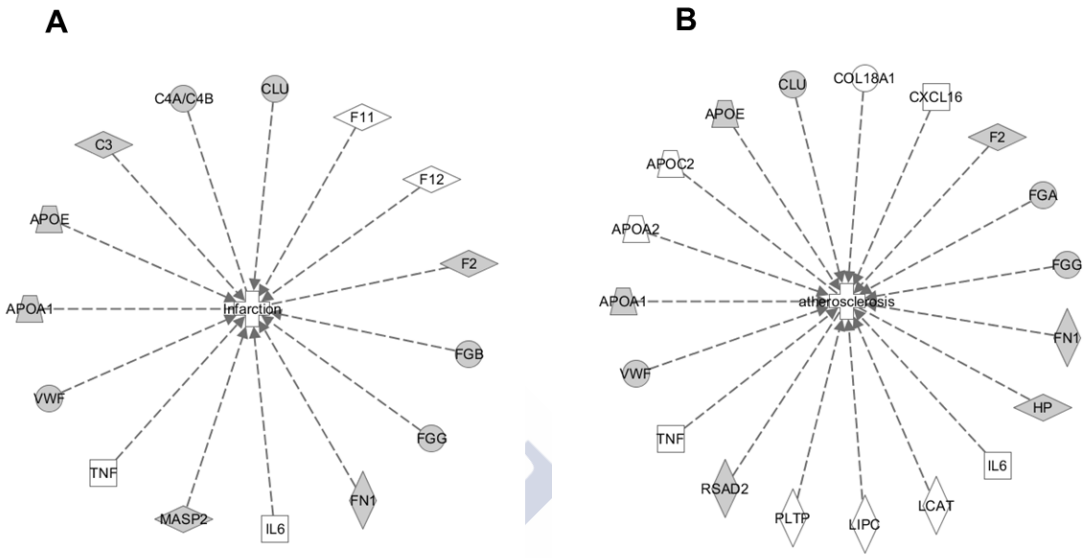


Figura 21. Las proteínas reguladas diferencialmente están directamente relacionadas con infarto (A) y con aterosclerosis (B). *Las proteínas identificadas en el estudio proteómico diferencial están marcadas como nodos sombreados con el nombre de su gen. Los nodos sombreados en gris representan las proteínas con expresión diferencial detectadas en el análisis proteómico. Los nodos no sombreados son las restantes proteínas de cada red.*

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 Estudio de plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo

Con el objetivo de completar el estudio proteómico realizado por nuestro grupo en plaquetas procedentes de sangre venosa,[175] surgió la idea de analizar el proteoma de plaquetas en contacto directo con el trombo coronario causante del infarto.

4.2.1 Características de los pacientes

Para el estudio de plaquetas procedentes de sangre arterial de pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (IAMCEST) se recogieron muestras de pacientes en el momento de su ingreso hospitalario. Se extrajeron 50 mL de sangre arterial por paciente (25 mL de sangre intracoronaria en contacto con el trombo y 25 mL de sangre periférica) a través de un catéter Pronto V3 (Vascular Solutions) que obstruye el flujo aterógrado permitiendo la recolección de la sangre bloqueada en las proximidades del trombo coronario causante del infarto. Las características clínicas básicas de los pacientes incluidos en este estudio se pueden consultar en las Tablas 8 y 10.

4.2.2 Análisis proteómico 2D-DIGE

Para comparar los proteomas de las plaquetas procedentes de sangre de la arteria coronaria y sangre de la arteria radial de pacientes IAMCEST, se realizó un análisis proteómico 2D-DIGE. Se emplearon un total de cinco geles 2D (réplicas técnicas) de bisacrilamida al 11% y tiras IPG de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7. El análisis se realizó utilizando *pools* de muestras de sangre intracoronaria y *pools* de muestras de sangre periférica de 10 pacientes, cuyas características clínicas básicas se resumen en la Tabla 8.

El análisis de imagen detectó una media de 1300 manchas proteicas por gel. Los criterios de selección de las diferencias significativas fueron las variaciones de intensidad de las manchas entre grupos ≥1,2 y valor $p<0,05$. Aplicando estos criterios, se detectaron un total de 16 diferencias significativas entre grupos (Figura 22), 11 de las cuales estaban sobreexpresadas en las muestras de intracoronaria y las 5 restantes disminuidas.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio proteómico intracoronario. Versión reducida.

Variable	**IAMCEST (N=10)**
Edad (años)	67 ± 14
Mujeres (%)	50
Hx hipertensión arterial (%)	60
Hx diabetes mellitus (%)	30
Hx dislipidemia (%)	40
Hx enfermedad coronaria (%)	0
Plaquetas/ µL	250500 ± 99850,2
Tratamientos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	90
Otros antiplaquetarios (%)	10
Anticoagulantes (%)	10

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

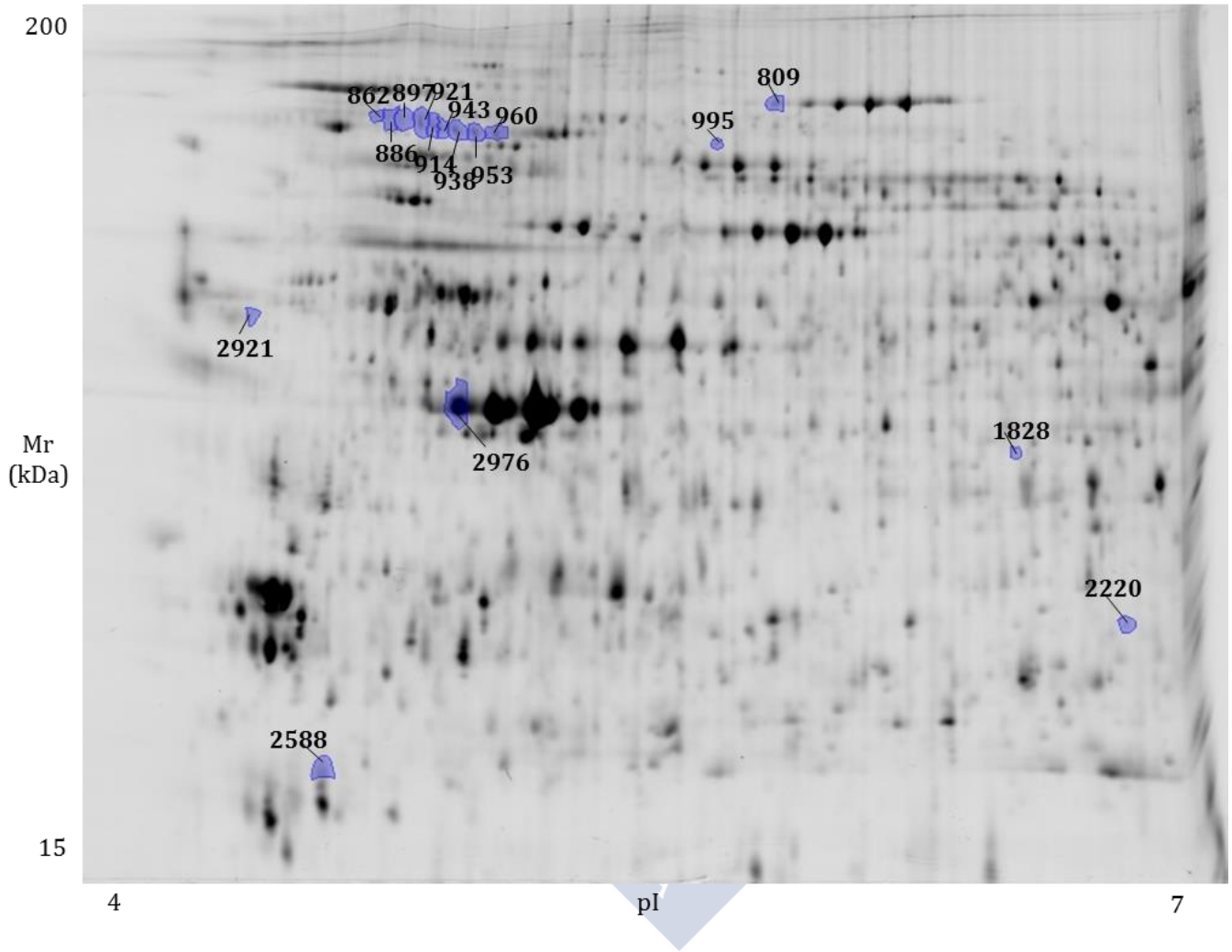


Figura 22. Análisis de imagen diferencial 2D-DIGE. Comparativa entre el proteoma de plaquetas procedentes de la arteria coronaria obstruida y el proteoma de plaquetas procedentes de la arteria radial. *Imagen representativa del análisis en escala de grises. Las manchas reguladas diferencialmente entre ambas condiciones de estudio se encuentran marcadas y numeradas. La* imagen representativa de un análisis 2D-DIGE donde se superpone la emisión de los fluoróforos Cy3 y Cy5 no se muestra en esta ocasión por que no se visualizan claramente las diferencias a color. Mr, masa molecular relativa; pI, punto isoeléctrico. *La imagen en alta resolución se puede consultar en el CD adjunto.*

4.2.3 Identificación de proteínas

Todas las diferencias detectadas fueron cortadas de los geles e identificadas satisfactoriamente mediante MALDI-MS/MS. La identificación indicó que esas 16 manchas proteicas se correspondían con 15 proteínas únicas (Tabla 9), la mayoría relacionadas con el citoesqueleto y la transducción de señales.

Tabla 9. Lista de manchas proteicas identificadas en el estudio de intracoronaria acompañadas de sus identificaciones. Versión reducida.

Proteína	Código UniProt	Mancha	Variación
Actin, cytoplasmic 1 (β-actin) ó Actin, cytoplasmic 2 (γ-actin)	ACTB_HUMAN ó ACTG_HUMAN	2976	-1,2
Beta-actin-like protein 2	ACBL_HUMAN	2976	-1,2
Coagulation factor XIII A chain	F13A_HUMAN	1828	-1,3
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_HUMAN	897	1,3
Integrin αIIb	ITA2B_HUMAN	862 886 897	1,2 1,2 1,3
Myosin regulatory light chain 12A ó Myosin regulatory light chain 12B	ML12A_HUMAN ó ML12B_HUMAN	2588	-1,3
Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9_HUMAN	2588	-1,3
Prefoldin subunit 6	PFD6_HUMAN	914	1,3
POTE ankyrin domain family member E	POTEE_HUMAN	960	1,2
POTE ankyrin domain family member F	POTEF_HUMAN	960	1,2
Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP-2)	SKAP2_HUMAN	2921	1,4
Talin-1	TLN1_HUMAN	995	-1,2
Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	886 897 921 938 943 953	1,2 1,3 1,4 1,3 1,5 1,5
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	UCRI_HUMAN	2220	1,2
Vinculin	VINC_HUMAN	809	-1,2

Todas las proteínas con expresión diferencial tienen un $p<0,05$. Una variación positiva indica que su expresión está aumentada en intracoronaria, mientras que un valor negativo de la variación indica que su expresión está disminuida en dicha condición. La versión extendida de esta tabla su puede consultar en el CD adjunto (Anexo IV, Tabla suplementaria 10).

4.2.4 Validación de los resultados

Para los estudios de validación se utilizó un grupo independiente de 11 pacientes con IAMCEST cuyas características clínicas básicas se muestran en la Tabla 10. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los grupos de pacientes de proteómica y de validación. Las proteínas seleccionadas fueron validadas por inmunodetección 1D y 2D. Las validaciones por 1D se realizaron en geles de poliacrilamida al 10%. Las inmunodetecciones por 2D se realizaron para poder visualizar cambios en Isoformas debidos a modificaciones postraduccionales y se emplearon tiras de IPG de 7 cm y rango de pH 4-7 (GE Healthcare) para la primera dimensión, y geles de poliacrilamida al 10% para la segunda.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluídos en las validaciones del estudio intracoronario. Versión reducida.

Variable	**IAMCEST (N=11)**
Edad (años)	66 ± 13
Mujeres (%)	27,3
Hx hipertensión arterial (%)	54,5
Hx diabetes mellitus (%)	36,4
Hx dislipidemia (%)	54,5
Hx enfermedad coronaria (%)	9,1
Plaquetas/ µL	248727,3 ± 74545,3
Tratamientos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	81,8
Otros antiplaquetarios (%)	18,2
Anticoagulantes (%)	0

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 4.

De entre las proteínas diferencialmente reguladas, se seleccionó la integrina αIIb (ITA2B), la proteína adaptadora Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP2), la proteína de citoesqueleto talina-1 (TLN-1), y la proteína glicoadhesiva trombospondin-1 (TSP-1). El criterio de selección fue el papel relevante que desempeñan estas proteínas en los eventos de activación plaquetaria.

a) La integrina αIIb y SKAP2 están aumentadas en plaquetas de sangre intracoronaria

La integrina αIIb es una proteína de membrana que forma parte de la proteína de membrana heterodimérica αIIbβ3 (GPIIb-IIIa), receptor de fibrinógeno. El análisis proteómico 2D-DIGE reveló la presencia de esta proteína en un *array* en la parte superior del gel, con tres manchas proteicas aumentadas en las muestras intracoronarias (ver Tabla 9). Los pesos moleculares teóricos y experimentales, así como los puntos isoeléctricos teóricos y experimentales, estaban muy próximos entre ellos (consultar Anexo III, Tabla suplementaria 10). Las validaciones por inmunodetección bidimensional en muestras individuales confirmaron los resultados del estudio proteómico (Figura 23A).

Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP2), es una proteína adaptadora relacionada con la vía de señalización de Src, con el remodelado de la actina y con la regulación de la correcta activación del sistema inmune. El análisis 2D-DIGE reveló la existencia de una única mancha proteica sobreexpresada en intracoronaria correspondiente con SKAP2 (ver Tabla 9), cuyos pesos moleculares teórico y experimental, así como sus puntos isoeléctricos teórico y experimental, estaban muy próximos (consultar Anexo III, Tabla suplementaria 10). Las validaciones individuales por inmunodeteccion bidimensional confirmaron el resultado proteómico (Figura 23B).

El control del carga realizado en geles monodimensionales (GAPDH) no reveló ninguna diferencia evidente en la cantidad de proteína cargada por paciente y condición (Figura 23C).

b) TSP-1 y talina-1 reguladas diferencialmente en las plaquetas de sangre intracoronaria

TSP-1 es una proteína adhesiva secretada por los gránulos-α tras la estimulación plaquetaria. En el análisis 2D-DIGE se identificaron 6 manchas proteicas en un área de unos 120 kDa identificadas como TSP-1, todas ellas aumentadas en las plaquetas intracoronarias (ver Tabla 9). Los experimentos de inmunodetección por 2D mostraron una tendencia en el aumento de los niveles de las isoformas de TSP-1 del rango de 120-140 kDa (Figura 24A), lo que está en línea con los resultados proteómicos. A pesar de que la cuantificación fue difícil de realizar debido al gran número de isoformas existentes y a la perdida de resolución de los geles 2D, la tendencia parece clara.

Talina-1, por su parte, es una proteína de citoesqueleto que juegan un papel fundamental en la activación plaquetaria y la agregación. En el estudio proteómico se detectó la presencia de talina-1 en una mancha proteica (nº 995) disminuída en plaquetas intracoronarias (ver

Tabla 9). Sin embargo, en este caso había una gran discrepancia entre los valores de peso molecular teórico y experimental (valor teórico 271 kDa, valor experimental 112 kDa) (consultar Anexo III, Tabla suplementaria 10). Dado el alto peso molecular de las principales isoformas de Talina-1, se decidió realizar validaciones mediante inmunodetección 1D. Este análisis no mostró ninguna diferencia de expresión entre los grupos, lo que sugiere que la mancha con expresión diferencial se correspondía a una isoforma debida a modificación postraduccional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

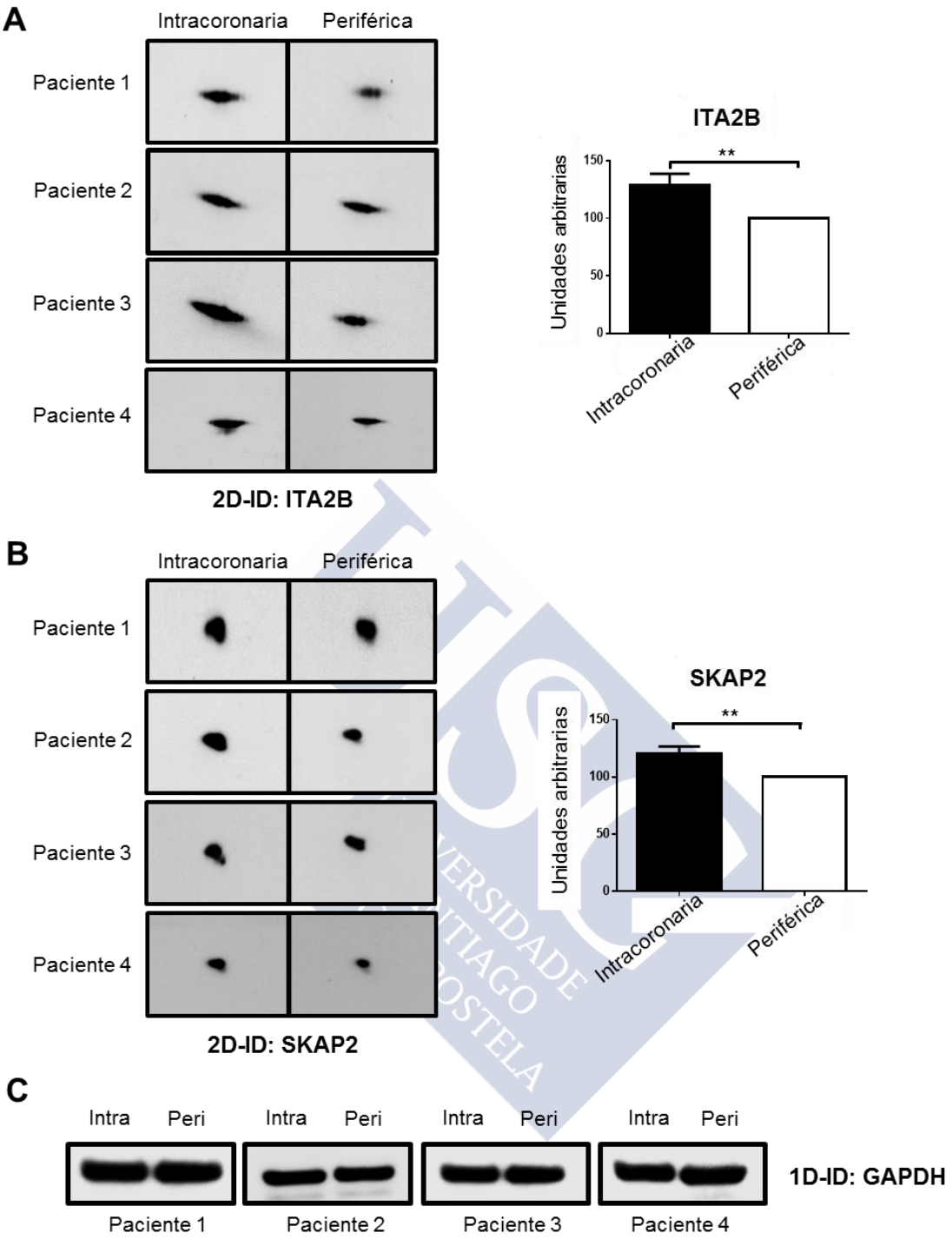


Figura 23. Validaciones por inmunodetección de ITA2B y SKAP2. Ambas proteínas están sobreexpresadas en las plaquetas intracoronarias de pacientes con IAMCEST. *(A) Imágenes representativas de validaciones individuales por inmunodetección 2D de ITA2B y gráfico densitométrico representando la intensidad media de las manchas y la desviación estándar. Análisis estadístico. (B) Imágenes representativas de validaciones individuales por inmunodetección 2D de SKAP2 y gráfico densitométrico representando la intensidad media de las manchas y la desviación estándar. Análisis estadístico. (C) Controles de carga de las muestras de los paneles A y B. ID, inmunodetección; **p<0,01; Intra, intracoronaria; Peri, periférica.*

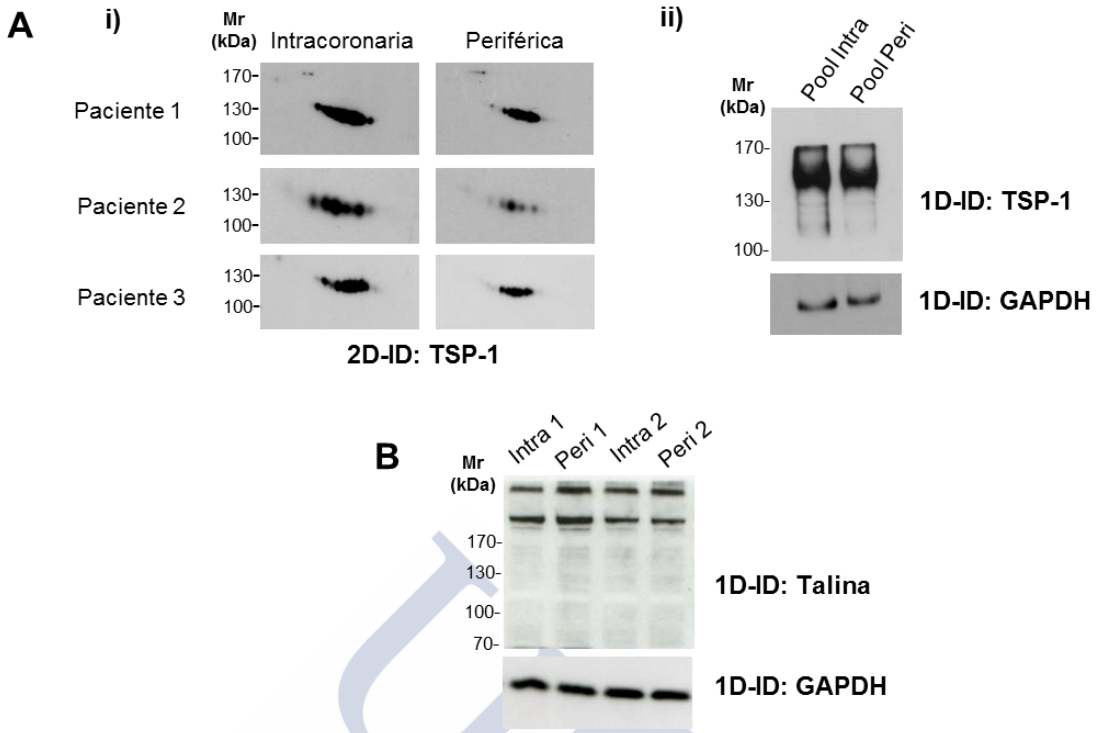


Figura 24. Validaciones por inmunodetección de TSP-1 y talina-1. TSP-1 y talina-1 están reguladas diferencialmente en las plaquetas intracoronarias. *(A) Validación de TSP1: imágenes representativas de validaciones individuales por inmunodetección 2D (B) Validación de talina-1: imágenes individuales representativas de validaciones individuales por inmunodetección 1D, control de carga y gráficos densitométricos representando la intensidad media de las bandas y error estándar. ID, inmunodetección; Intra, intracoronaria; Peri, periférica; Mr, masa molecular relativa.*

4.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST

4.3.1 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre venosa de pacientes con IAMCEST

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la implicación fisiopatológica que tiene la vía de señalización de GPVI en el infarto agudo de miocardio, surgió la idea de analizar estado de activación de la vía utilizando el proteoma de plaquetas obtenidas a partir de sangre venosa de pacientes con IAMCEST.

4.3.1.1 Características de pacientes y controles

El estudio de la vía de señalización de GPVI en pacientes con IAMCEST incluyó muestras de sangre venosa de 19 pacientes con IAMCEST (grupo de muestras llamado IAMCEST) y 16 controles CROIAMCEST (grupo de muestras llamado CROIAMCEST). Las muestras de los controles fueron seleccionadas de modo que no hubiese diferencias significativas con el grupo de pacientes agudos en las siguientes variables: edad, sexo, tratamiento antiplaquetario y diabetes mellitus. Además de la esperada diferencia en tener una historia previa de enfermedad coronaria, el análisis estadístico no reveló la existencia de otras diferencias significativas entre ambos grupos. Las características clínicas básicas de los pacientes y controles del estudio se muestran en las Tablas 11 y 13.

4.3.1.2 Análisis proteómico

El estudio proteómico consistió en la activación de plaquetas aisladas de sangre venosa de 5 pacientes con IAMCEST y de 5 controles CROIAMCEST, utilizando un agonista especifico del receptor GPVI, el *collagen-related peptide* o CRP, para seguir los niveles de activación de la vía. Como la vía de GPVI funciona a través de fosforilaciones en tirosina (pTyr) de las proteínas que la conforman, el análisis proteómico se basó en inmunoprecipitaciones utilizando el anticuerpo anti-pTyr 4G10 conjugado a agarosa. Las inmunoprecipitaciones de plaquetas basales y activadas con CRP ($3x10^8$ plaquetas) se realizaron utilizando 10 µg del anticuerpo anti-pTyr 4G10 conjugado a agarosa. Se realizaron *pools* juntando 5 inmunoprecipitaciones (una por paciente) de cada condición y se resolvieron por 1D-PAGE en un gel comercial del 4-12% NuPAGE (Invitrogen), que finalmente si tiñó con Sypro Ruby. Las características clínicas básicas del subgrupo de pacientes utilizados para el estudio proteómico se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión reducida.

Variable	IAMCEST (N=5)	CROIAMCEST (N=5)
Edad (años)	64 ± 12	61 ± 16
Mujeres (%)	0	0
Hx hipertensión arterial (%)	40	40
Hx diabetes mellitus (%)	20	0
Hx dislipidemia (%)	60	60
Hx enfermedad arterial coronaria (%)*	20	100
Plaquetas/µL	269400 ± 114137,2	292200 ± 50642,9
Tratamientos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 5.*

El estudio proteómico reveló una mayor activación de la vía de GPVI en las plaquetas de los pacientes con IAMCEST, comparado con los controles, cuando se activan con el agonista CRP (Figura 25A). En concreto se detectaron 7 bandas aumentadas en plaquetas de pacientes con IAMCEST activadas con CRP, frente a plaquetas de controles CROIAMCEST activadas con el mismo agonista. Las 7 bandas fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas para la identificación de sus proteínas. Sin embargo, es importante destacar que el gel del análisis proteómico muestra proteína total, por lo que puede haber proteínas reclutadas de forma inespecífica al complejo de señalización durante el proceso de inmunoprecipitación que no presenten un mayor nivel de pTyr que los controles. Por esta razón se corrieron *pools* de los lisados totales de las plaquetas de los mismos pacientes, recogidos justo antes de realizar las inmunoprecipitaciones. Para ello se utilizó de nuevo un gel 4-12% NuPAGE Bis-Tris y, tras la electroforesis, se realizó inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina con el anticuerpo anti-pTyr 4G10. En este caso el resultado muestra de forma fiel un aumento considerable de la fosforilación/activación de la vía de GPVI en pacientes con IAMCEST (Figura 25B).

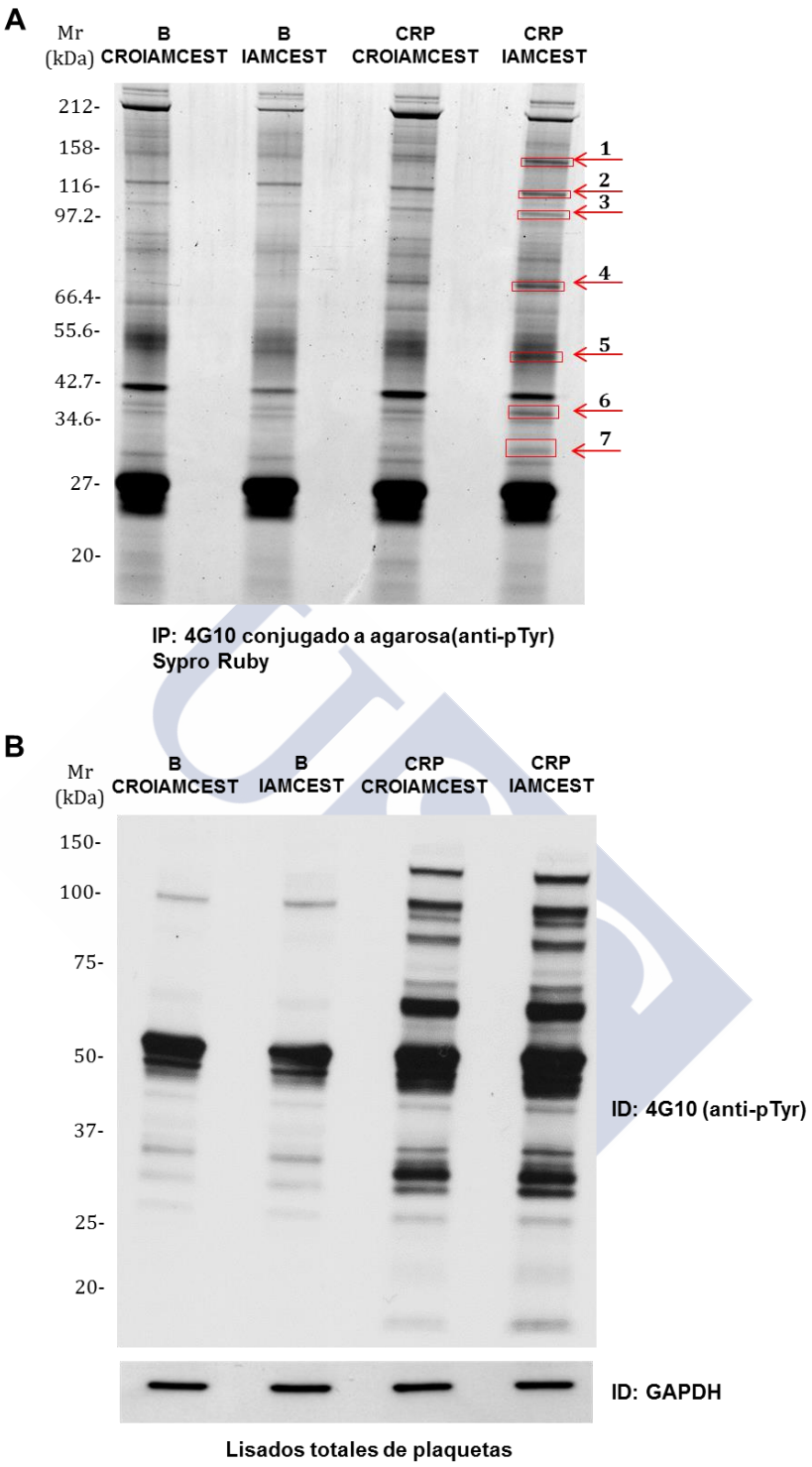


Figura 25. Análisis de la vía de señalización de GPVI en plaquetas de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST: proteínas fosforiladas en residuos tirosina. *(A) Tinción de proteína total en un gel en gradiente (4-12%) NuPAGE (Invitrogen) en el que se cargaron pools de proteínas fosforiladas en tirosina de plaquetas basales y estimuladas con CRP, obtenidas tras inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-pTyr 4G10 conjugado a agarosa. (B) Inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina (anticuerpo monoclonal 4G10) y control de carga (GAPDH) utilizando pools de los lisados totales de plaquetas obtenidos antes de realizar las inmunoprecipitaciones. Basal, plaquetas basales; CRP, plaquetas estimuladas con CRP (10 µg/mL, 90 seg); IP, inmunoprecipitación; ID, inmunodetección; Mr, masa molecular relativa.*

4.3.1.3 Identificación de proteínas

Las bandas cortadas fueron analizadas por LC-MS/MS llevando a la identificación de 24 proteínas únicas. Sin embargo, en la mayoría de las bandas se identificó más de una proteína por lo que era indispensable validar los resultados con el fin de determinar si las proteínas de la vía de señalización de GPVI eran las responsables del aumento de intensidad de la banda. Entre las identificaciones se encontraron algunas proteínas de señalización pertenecientes a la vía de GPVI, incluyendo la tirosina quinasa Syk, los adaptadores SLAP-130 y GADS, la enzima PLCγ2, la proteína transmembrana G6f, y los adaptadores SLP-76 y Dok-2. Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Lista de proteínas identificadas en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión reducida.

Banda	Código UniProt	Nombre
1	PLCG2_HUMAN	Phospholipase C-gamma-2
	ZO2_HUMAN	Tight junction protein
	MMRN1_HUMAN	Multimerin-1
2	FYB_HUMAN	FYN-binding protein (SLAP130)
	PK3CB_HUMAN	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform
	ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb
	ARHGB_HUMAN	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
3	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1
	FYB_HUMAN	FYN-binding protein (SLAP130)
	ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4
4	SRC8_HUMAN	Src substrate cortactin
	LCP2_HUMAN	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SLP76)
	KSYK_HUMAN	Tyrosine-protein kinase SYK
	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein
5	SKAP2_HUMAN	Src kinase-associated phosphoprotein 2
	DOK2_HUMAN	Docking protein 2
	TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain
	TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain
6	MK14_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 14
	GRAP2_HUMAN	GRB2-related adapter protein 2 (GADS)
	PPIP2_HUMAN	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2
	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1
	PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1
7	CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta
	LY66F_HUMAN	G6f

Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las 7 bandas que presentaban mayor intensidad en plaquetas de pacientes con IAMCEST activadas con CRP que en plaquetas de controles activadas con el mismo agonista. La versión extendida de esta tabla su puede consultar en el CD adjunto (Anexo IV, Tabla suplementaria 11).

4.3.1.4 Validación de los resultados. Las formas pTyr de PLCγ2, SLP76, DOK2 y G6F están aumentadas en plaquetas de sangre venosa de pacientes con IAMCEST activadas con CRP

Los estudios de validación se realizaron en un grupo independiente de 14 pacientes y 11 controles, cuyas características clínicas básicas se resumen en la Tabla 13. Para las validaciones se inmunoprecipitaron plaquetas basales y activadas con CRP ($2x10^8$ plaquetas) utilizando 5 µg del anticuerpo anti-pTyr 4G10 conjugado con agarosa. Tras la inmunoprecipitación, las proteínas se separaron en geles de bisacrilamida al 10% o geles en gradiente (4-12%) NuPAGE (Invitrogen), se transfirieron a membranas de PVDF y se realizaron inmunodetecciones con los anticuerpos de interés.

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio de validación de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión reducida.

Variable	IAMCEST (N=14)	CROIAMCEST (N=11)
Edad (años)	69 ± 14	64 ± 17
Mujeres (%)	21,4	9,1
Hx hipertensión arterial (%)	50	63,6
Hx diabetes mellitus (%)	35,7	18,2
Hx dislipidemia (%)	64,3	54,6
Hx enfermedad arterial coronaria (%)*	7,1	100
Plaquetas/ µL	246538,5 ± 90981,6	244727,3 ± 57775,6
Tratamientos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx: Historia de; *: p<0,05. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 6.*

De entre todas las proteínas identificadas se eligieron cuatro pertenecientes a la vía de señalización de GPVI para su validación, cuyos pesos moleculares fuesen bastante diferentes con el fin de analizarlas fácilmente por inmunodetección tras la inmunoprecipitación de proteínas pTyr. Las cuatro proteínas seleccionadas fueron (de mayor a menor peso molecular): la enzima PLCγ2, los adaptadores SLP-76 y Dok-2, y la proteína transmembrana G6f. Los resultados de las inmunodetecciones revelaron un aumento significativo de los niveles de pTyr para las cuatro proteínas estudiadas cuando

comparamos plaquetas basales y plaquetas estimuladas (Figura 26). Cuando comparamos plaquetas activadas con CRP entre grupos (IAMCEST vs CROIAMCEST), los resultados mostraron un aumento de los niveles de pTyr en los pacientes IAMCEST para las cuatro proteínas, con diferencias estadísticamente significativas en el caso de PLCγ2, Dok-2 y G6f (Figura 26). El aumento observado en los niveles de pTyr se traduce en un aumento en la activación de la vía de señalización de GPVI.

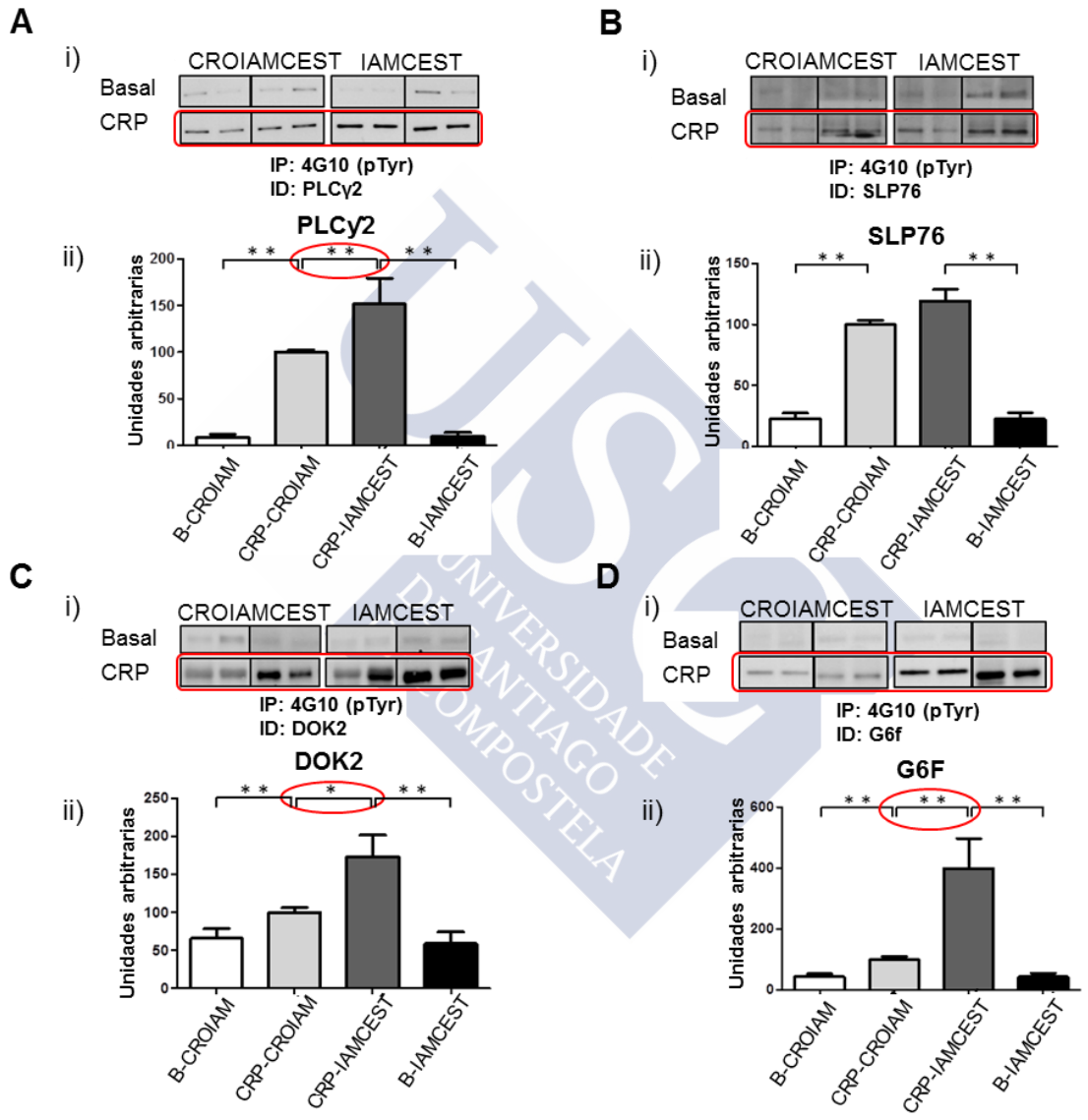


Figura 26. La activación de la vía de señalización de GPVI esta aumentada en plaquetas de pacientes con IAMCEST. *Inmunodetección de PLCγ2 (A), SLP76 (B), Dok-2 (C) y G6f (D) tras la inmunoprecipitación de proteínas pTyr. i) Imágenes representativas de pacientes y controles individuales. ii) Gráficos densitométricos representando la intensidad media de las bandas, el error estándar y el análisis estadístico. Las diferencias significativas se representan como: *p<0,05; **p<0,01. Basal, plaquetas basales; CRP, plaquetas estimuladas con CRP (10 µg/mL, 90 seg). IP, inmunoprecipitación; ID, inmunodetección.*

Los lisados totales también fueron separados por electroforesis 1D para realizar controles de carga con el fin de demostrar que no había diferencias de carga en los lisados utilizados para las inmunoprecipitaciones.

4.3.1.5 Estudio piloto de agregación

Partiendo de la hipótesis de la existencia de un mayor número de receptores GPVI en la superficie de las plaquetas de pacientes con IAMCEST, se realizó un estudio piloto de agregación tras la estimulación plaquetaria con CRP o colágeno. Este estudio incluyó un nuevo grupo formado por 5 pacientes con IAMCEST y 5 controles CROIAMCEST cuyas características clínicas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio piloto de agregación tras la estimulación de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión reducida.

Variable	**IAMCEST (N=5)**	**CROIAMCEST (N=5)**
Edad (años)	73 ± 13	64 ± 15
Mujeres (%)	20	20
Hx hipertensión arterial (%)	20	20
Hx diabetes mellitus (%)	20	40
Hx dislipidemia (%)	20	60
Hx enfermedad arterial coronaria (%)*	0	100
Plaquetas/µL	239000 ± 41364,2	187000 ± 61110,6
Tratamientos		
Aspirina (%)	80	100
Clopidogrel (%)	60	60
Otros antiplaquetarios (%)	40	40
Anticoagulantes (%)	0	0

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 7.*

En este caso las plaquetas ($0{,}9x10^8$) fueron activadas con distintas dosis de CRP (10, 5 y 3 µg/mL) y colágeno (10 y 5 µg/mL). Se utilizaron activaciones con trombina (0,75 U/mL) a modo de control. Los resultados muestran un aumento de los niveles de agregación en pacientes con IAMCEST frente a controles CROIAMCEST cuando se activan sus plaquetas con CRP y colágeno. La diferencia en agregación es muy acusada a dosis bajas e intermedias de los agonistas de GPVI (CRP y colágeno), mientras que a dosis máximas la tendencia,

aunque clara, no llega a ser significativa. No hay diferencia en la respuesta a la agregación inducida por trombina. Los resultados se muestran en la Figura 27.

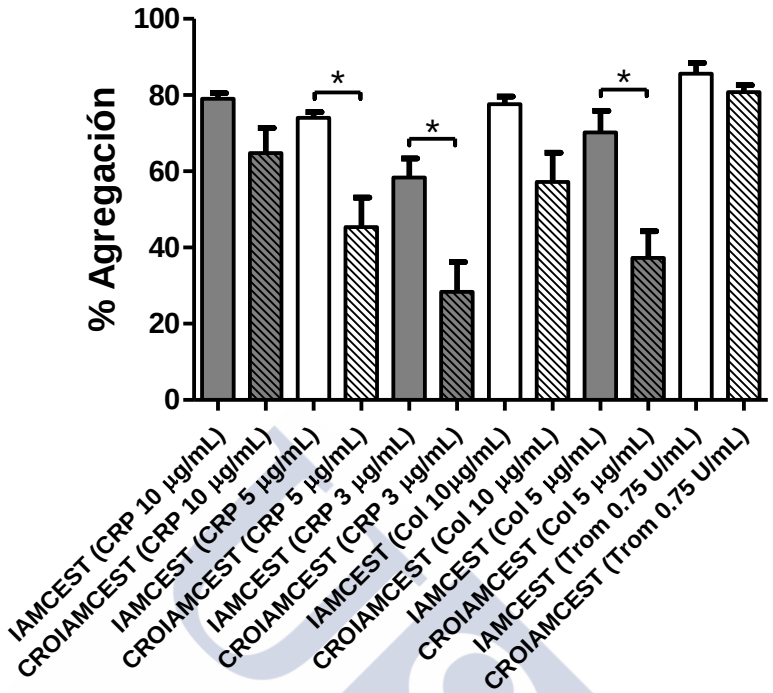


Figura 27. La agregación plaquetaria inducida por la activación de GPVI es mayor en pacientes con IAMCEST. *Se induce agregación plaquetaria con CRP y colágeno en plaquetas de pacientes con IAMCEST y CROIAMCEST. La agregación inducida por trombina se utiliza como control. Gráfico densitométrico representando la media de la agregación y el error estándar de 5 pacientes y 5 controles. Análisis estadístico. *p<0,05.*

4.3.2 Estudio de la vía de señalización de GPVI en sangre arterial de pacientes con IAMCEST

Partiendo de la hipótesis de que las plaquetas en contacto directo con el trombo podrían reflejar mejor el aumento de los niveles de activación de la vía de GPVI observado en sangre venosa periférica, y con el fin de profundizar en el conocimiento de la enfermedad, se decidió estudiar los niveles de activación de la vía de GPVI en dichas plaquetas. El objetivo es determinar si las plaquetas en contacto directo con el trombo presentan mayores niveles de activación de la vía de GPVI que aquellas plaquetas más alejadas del lugar de la oclusión. Para ello se compararon plaquetas de sangre arterial en contacto con el trombo (grupo de muestras llamado intracoronaria) y plaquetas obtenidas de sangre periférica de la arteria radial por la que se introdujo el catéter (grupo de muestras llamado periférica). En este estudio cada paciente es su propio control.

4.3.2.1 Características de pacientes

Se recogieron muestras de 16 pacientes con IAMCEST en el momento de la intervención coronaria percutánea. Las características clínicas básicas de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre arterial. Versión reducida.

Variable	**IAMCEST (N=16)**
Edad (años)	67 ± 13
Mujeres (%)	37.5
Hx hipertensión arterial (%)	50
Hx diabetes mellitus (%)	31.25
Hx dislipidemia (%)	50
Hx enfermedad arterial coronaria (%)	6.25
Plaquetas/µL	243187,5 ± 79313,1
Tratamientos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	81,3
Otros antiplaquetarios (%)	18,8
Anticoagulantes (%)	6,3

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de. Una versión extendida de las características clínicas de estos pacientes se puede consultar en el Anexo II, Tabla suplementaria 8.

4.3.2.2 Inmunodetecciones. Las formas pTyr de PLCγ2, SLP76, DOK2 y G6F están aumentadas en plaquetas de sangre arterial de pacientes con IAMCEST activadas con CRP

Para determinar el grado de activación de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas que se encuentran en contacto directo con el trombo, se decidió utilizar los mismos marcadores que en el estudio de GPVI realizado en sangre venosa: PLCγ2, SLP76, Dok-2 y G6f.

Del mismo modo que en el estudio de sangre venosa, se inmunoprecipitaron las plaquetas basales y activadas con CRP ($2x10^8$ plaquetas) utilizando 5 µg del anticuerpo anti-pTyr 4G10 conjugado con agarosa. Tras la inmunoprecipitación, las proteínas se separaron en geles de bisacrilamida al 10% o geles en gradiente (4-12%) NuPAGE (Invitrogen), se transfirieron a membranas de PVDF y se realizó la inmunodetección de las proteínas de interés. Los resultados de las inmunodetecciones mostraron un aumento claro de los niveles de pTyr en las muestras procedentes de la arteria coronaria, con diferencias estadísticamente significativas en el caso de las proteínas adaptadoras SLP76 y Dok-2 (Figura 28B y C) y también en el caso de la proteína transmembrana G6f (Figura 28D). Los niveles de pTyr en el caso de PLCγ2 presentaron una clara tendencia al aumento que no llegó a ser estadísticamente significativa, quizá debido al bajo número de muestras empleado (Figura 28A). El aumento observado en los niveles de pTyr de estas proteínas se traduce en un aumento en la activación de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas en contacto directo con el trombo frente a las plaquetas alejadas del lugar del daño.

En este caso también se separaron por electroforesis monodimensional lisados totales de las muestras utilizadas para las inmunoprecipitaciones para realizar controles de carga.

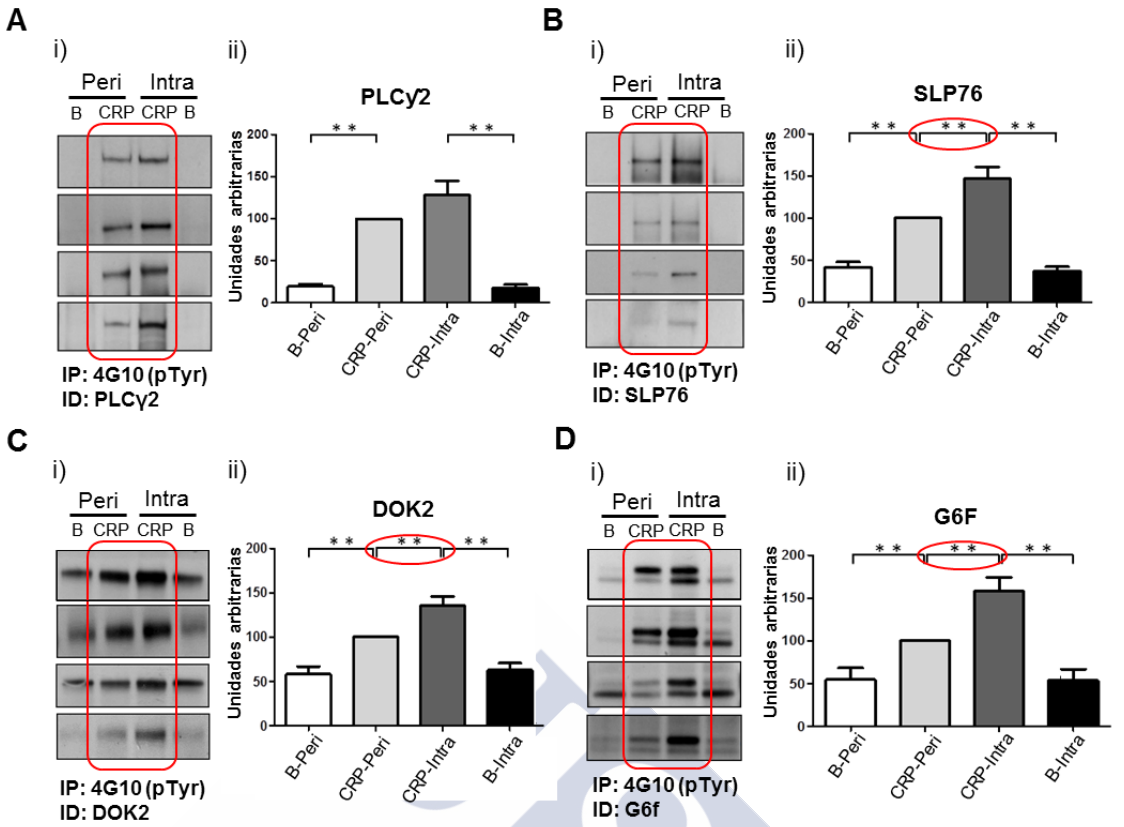


Figura 28. La activación de la vía de señalización de GPVI está aumentada en plaquetas en contacto directo con el trombo. *Comparativa entre plaquetas procedentes de sangre obtenida de la arteria coronaria y de sangre obtenida de la arteria radial. Inmunodetección de PLCγ2 (A), SLP76 (B), Dok-2 (C) y G6f (D) tras la inmunoprecipitación de proteínas pTyr. i) Imágenes representativas de pacientes individuales. ii) Gráficos densitométricos representando la intensidad media de las bandas, el error estándar y el análisis estadístico. Las diferencias significativas se representan como: *p<0,05; **p<0,01. En el análisis estadístico de las densitometrías se dio valor 100 a la banda de las plaquetas periféricas estimuladas con CRP para poder así comparar todos los pacientes. Basal, plaquetas basales; CRP, plaquetas estimuladas con CRP (10 µg/mL, 90 seg); IP, inmunoprecipitación; ID, inmunodetección.*

4.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI

Teniendo en cuenta el papel relevante que juega el receptor GPVI en los SCAs, y más en concreto habiendo demostrado el papel clave que juega la activación de dicho receptor en el IAMCEST, no cabe duda de que su inhibición podría suponer un gran avance en el tratamiento de estas enfermedades. En este contexto se realizaron tres aproximaciones independientes relacionadas con la inhibición del receptor GPVI.

4.4.1 Inhibición de la vía de señalización de GPVI mediante el fragmento Fab del anticuerpo OM2

La primera aproximación a la inhibición del receptor plaquetario GPVI se realizó utilizando el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 (Fab-OM2). Como se ha explicado en la introducción, el anticuerpo monoclonal OM2 pertenece a un conjunto de anticuerpos obtenidos a través de la inmunización de ratones *knockout* para GPVI. En un estudio publicado en 2007, Matsumoto y colaboradores describen este fragmento Fab como un potente inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por colágeno, inhibiendo además la liberación de ADP y la formación de TXA_2 inducidas por colágeno, y la adhesión plaquetaria a colágeno inmovilizado en condiciones estáticas y de flujo. Proponen además que Fab-OM2 reconoce el mismo epitopo del receptor GPVI que el CRP y que el anticuerpo OM2 completo (IgG-OM2) induce agregación plaquetaria potente.[176] El anticuerpo IgG-OM2 también ha sido cedido por Otsuka Maryland Medicinal Laboratories.

Tras la puesta a punto del protocolo de trabajo, se inició el estudio de la activación e inhibición del receptor de colágeno GPVI con el fin de evaluar en detalle el efecto de dicho fragmento Fab sobre la vía de activación de GPVI. Los estudios se realizaron a nivel agregación y a nivel bioquímico utilizando plaquetas de donantes sanos, con vistas a extender el estudio a pacientes con SCAs en un futuro próximo.

4.4.1.1 Estudios de agregación en donantes sanos

Las activaciones e inhibiciones se realizaron en un agregómetro como se explica en la sección de material y métodos. Se realizaron activaciones utilizando 1,5x10^8 plaquetas para probar diferentes dosis de CRP con el fin de determinar cuál es la concentración mínima del agonista que desencadena una respuesta de agregación máxima. Así se determinó que la concentración mínima para conseguir la máxima agregación plaquetaria son 5 µg/mL de CRP, y que la agregación inducida por 1 µg/mL de IgG-OM2 es máxima (Figura 29). Se realizaron activaciones con trombina y *rhodocytin* a modo de control.

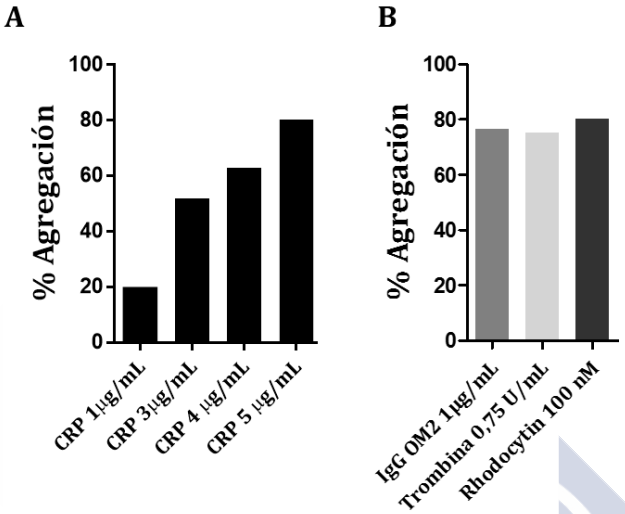


Figura 29. Porcentaje de agregación inducida por diferentes agonistas. *(A) Agregación inducida por diferentes dosis de CRP. (B) Agregación inducida por IgG-OM2 y activaciones control con trombina y rhodocytin. Los resultados muestran la media obtenida a partir de dos experimentos.*

Habiendo determinado que CRP 5 µg/mL es la mínima dosis del agonista que desencadena máxima respuesta de agregación plaquetaria, se utilizó esta dosis para estudiar el efecto inhibitorio que tienen diferentes dosis de Fab-OM2 sobre dicha agregación. Así, se determinó que la IC50 del Fab-OM2 es de 0,25 µg/mL, mientras que la inhibición total se consigue con 1 µg/mL del inhibidor (Figura 30A). Además, se consiguió la inhibición completa de la agregación inducida por 1 µg/mL de IgG-OM2 utilizando 1 µg/mL de Fab-OM2, lo que demuestra una vez más la actuación específica tanto de Fab-OM2 como de IgG-OM2 sobre el receptor GPVI. En el caso de la trombina y *rhodocytin* Fab-OM2 no tuvo ningún efecto inhibitorio (Figura 30B).

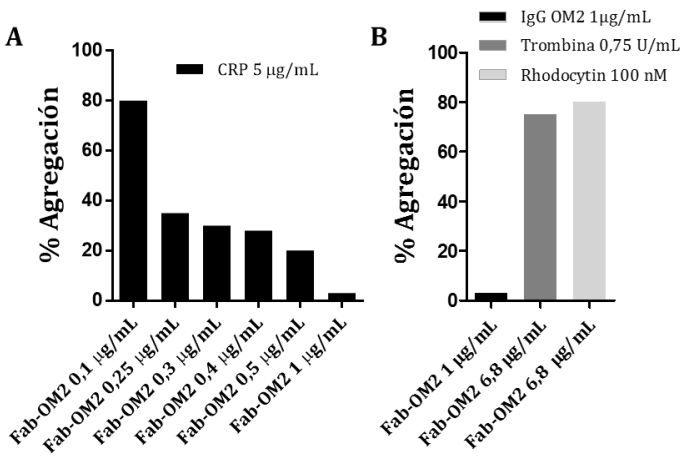


Figura 30. Porcentaje de agregación tras la inhibición con Fab-OM2. *(A) Inhibición con diferentes dosis de Fab-OM2 tras la activación plaquetaria con CRP 5 µg/mL. (B) Inhibición con Fab-OM2 de la activación inducida por IgG 1µg/mL, por trombina 0,75 U/mL y por rhodocytin 100 nM. Los resultados muestran la media obtenida a partir de dos experimentos.*

4.4.1.2 Estudios bioquímicos en donantes sanos

Del mismo modo que en los estudios de agregación, se realizaron activaciones e inhibiciones utilizando de plaquetas ($4x10^8$) procedentes de donantes sanos para realizar un estudio bioquímico de la vía de señalización de GPVI. En este caso se utilizaron inhibidores de la agregación y de los mediadores secundarios como se indica en la sección de material y métodos, con el fin de asegurarnos que la activación observada se debe únicamente al receptor activado en casa caso. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-pTyr 4G10.

Tras la activación plaquetaria con CRP 5 µg/mL se realizó una primera aproximación utilizando dosis de Fab-OM2 comprendidas entre 0,1 y 0,3 µg/mL, consiguiendo una inhibición mínima con la primera dosis y una inhibición máxima con la segunda (Figura 31A). Se observó que la modulación de la inhibición se encontraba entre 0,2 y 0,3 µg/mL de Fab-OM2, por lo que en una segunda aproximación se utilizaron dosis comprendidas en ese rango (Figura 31B).

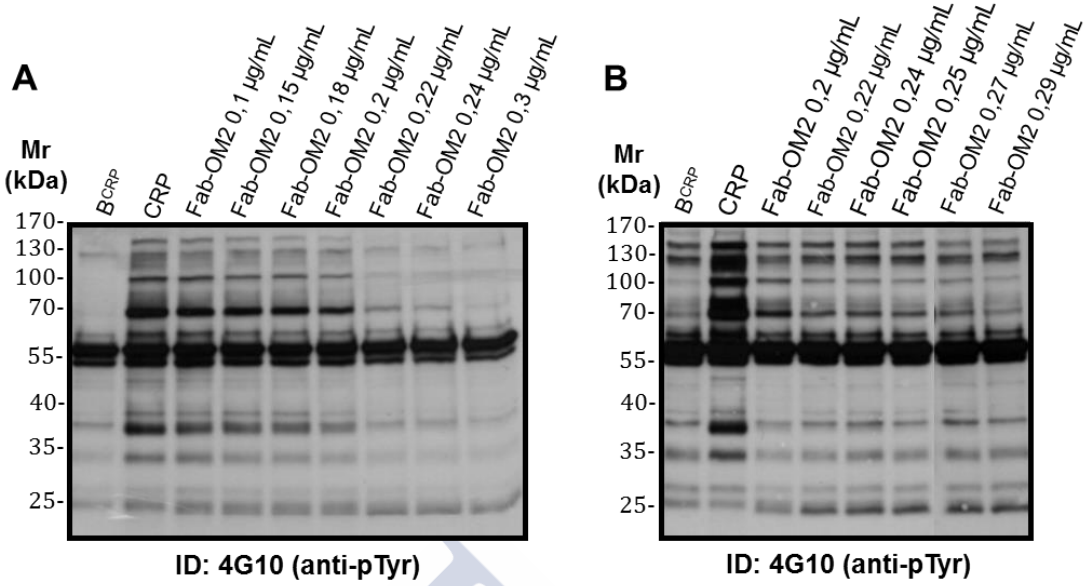


Figura 31. Análisis bioquímico de la vía de señalización de GPVI: inhibición con diferentes dosis de Fab-OM2 tras la activación plaquetaria con CRP 5µg/mL. *(A) Modulación de la inhibición con dosis altas y bajas de Fab-OM2. (B) Modulación de la inhibición con dosis intermedias de Fab-OM2.*

4.4.2 Estudio de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y CRP e inhibición de la misma con inhibidores específicos de los principales receptores de colágeno

Con el fin de determinar cuál es el principal receptor de colágeno responsable de la agregación plaquetaria, se realizó un estudio utilizando alícuotas de plaquetas ($2x10^8$) procedentes de donantes sanos que fueron activadas con colágeno 30 µg/mL y 3 µg/mL o con CRP 5µg/mL. Para inhibir la agregación se utilizaron inhibidores específicos de los principales receptores de colágeno (α2β1 y GPVI). Se utilizó BTT-3033 como inhibidor específico de α2β1 y Fab-OM2 como inhibidor específico de GPVI. Las alícuotas de plaquetas se preincubaron 5 minutos con el inhibidor en cuestión antes de realizar las activaciones.

Como era de esperar, los resultados mostraron que la adición de 1 µg/mL de Fab-OM2 inhibe por completo la agregación inducida por CRP 5 µg/mL (Figura 32A). En cuanto a la agregación inducida por colágeno 30 µg/mL, la máxima inhibición de la agregación por parte de Fab-OM2 se consiguió con 51 µg/mL, siendo capaz de inhibir la agregación en un 50%. Sin embargo, cuando se utilizó una dosis menor de colágeno (3 µg/mL) la misma dosis de Fab-OM2 fue capaz de inhibir la agregación en casi un 90%. Por otro lado, al tratar de inhibir el otro de los principales receptores de colágeno (α2β1) utilizando BTT-3033 13 µM, cuya IC50 es 130 nM, no se detectó disminución de la agregación tras la estimulación plaquetaria con 3 y 30 µg/mL de colágeno. Finalmente, para descartar que esta diminución

de la agregación pudiera deberse a un efecto tóxico de la elevada concentración de Fab-OM2, se preincubaron plaquetas con 51 µg/mL de Fab-OM2 y se activaron con 0,75 U/mL de trombina, mostrando una activación completamente normal y equiparable a la de la trombina sin inhibidor. Los resultados anteriores se muestran en la Figura 32B.

En conjunto, los resultados muestran que GPVI es el principal receptor responsable de la agregación/activación inducida por colágeno.

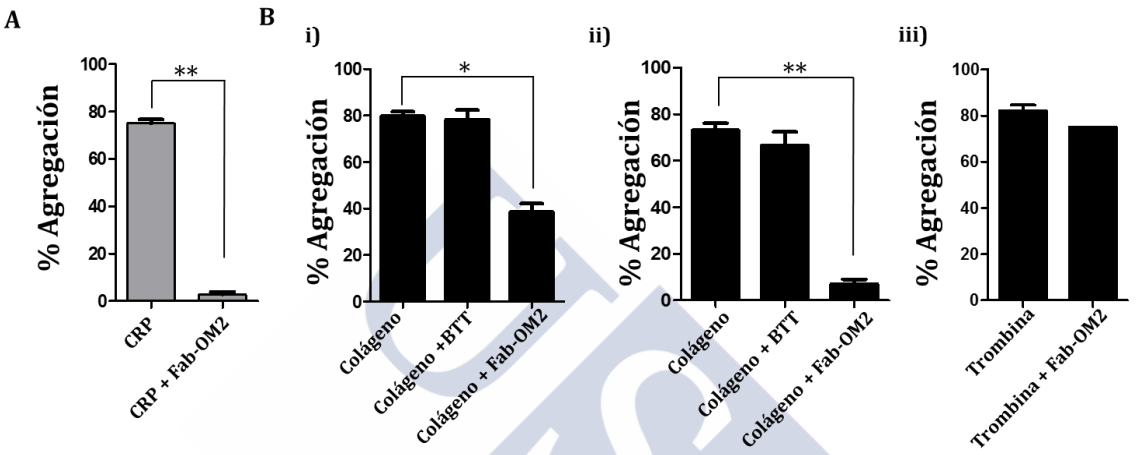


Figura 32. Efecto de los inhibidores de GPVI y α2β1 en la agregación inducida por colágeno y CRP. *(A) Plaquetas activadas con CRP 5 µg/mL e inhibidas con Fab-OM2 1 µg/mL. (B) i) Plaquetas activadas con colágeno 30 µg/mL e inhibidas con Fab-OM2 51 µg/mL o BTT-3033 13 µM. ii) Plaquetas activadas con colágeno 3 µg/mL e inhibidas con Fab-OM2 51 µg/mL o BTT-3033 13 µM. iii) Plaquetas activadas con trombina 0,75 U/mL e inhibidas con Fab-OM2 51 µg/mL.*, p<0,05; **, p<0,01.*

4.4.3 Búsqueda de pequeños inhibidores de GPVI

Con el fin de encontrar pequeñas moléculas que pudiesen inhibir GPVI de forma eficaz, se puso a punto un protocolo miniaturizado para estudiar los niveles de activación plaquetaria mediante técnicas de cribado de alto rendimiento (*high-througput screening,* HTS) utilizando plaquetas procedentes de donantes sanos. El nivel de activación plaquetaria se evaluó indirectamente a través de los cambios producidos en los niveles de calcio intracelular, utilizando para ello el kit Calcium 4 (Molecular Devices).

Durante la puesta a punto se realizaron curvas de dosis respuesta de CRP y se determinó que la mínima dosis de CRP que consigue una liberación de calcio máxima es de 3 µg/mL. Utilizando ésta dosis de CRP se evaluó el efecto que tiene la adición de diferentes dosis de Fab-OM2 en los niveles de calcio intracelular. Los resultados mostraron que la adición de 3

µg/mL del inhibidor consigue disminuir los niveles de calcio intracelular al nivel de los de plaquetas basales, mientras que 1 µg/mL consigue una reducción drástica pero menor. Estos resultados se muestran en la Figura 33.

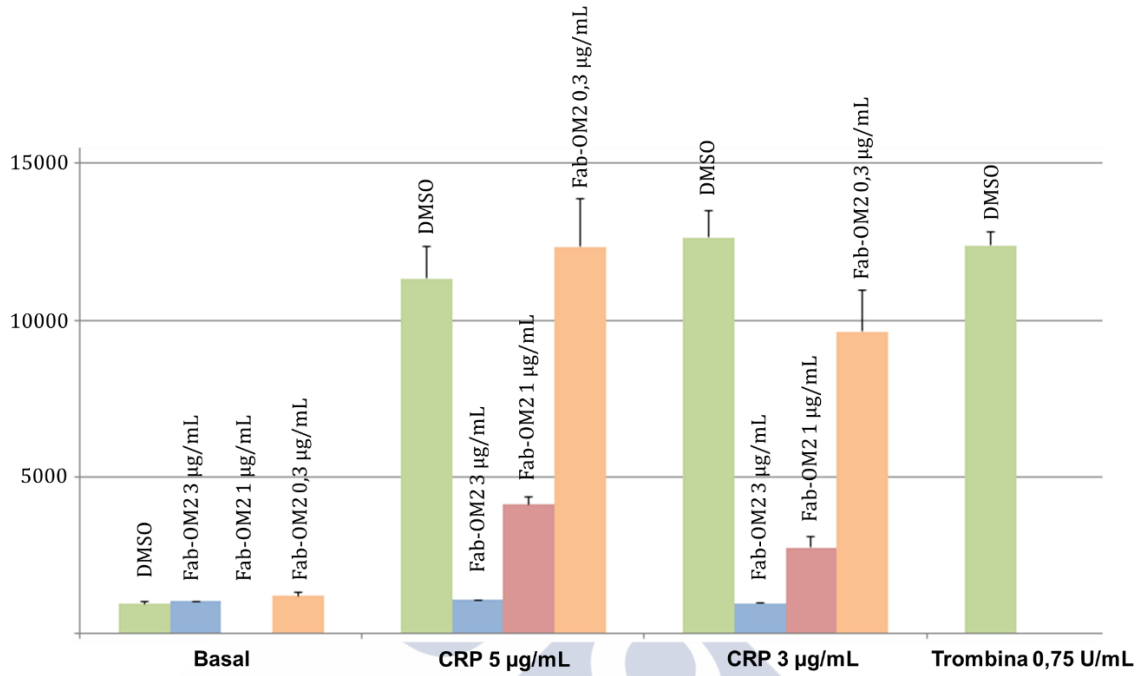


Figura 33. Efecto del inhibidor Fab-OM2 en los niveles de calcio intracelular tras la activación plaquetaria con CRP*. Las plaquetas fueron activadas con CRP 5 y 3 µg/mL e inhibidas con Fab-OM2 3, 1 y 0,3 µg/mL. En todos los casos se utilizaron 10^7 plaquetas por pocillo, y las activaciones se realizaron en condiciones no agregantes y en presencia de inhibidores de los mediadores secundarios. Se utilizó trombina como control de la activación plaquetaria.*

Una vez puesto a punto el protocolo miniaturizado para técnicas de cribado de alto rendimiento, se evaluó la actividad inhibitoria de 1120 compuestos procedentes de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick, a una única dosis del fármaco (dosis máxima). De todos los compuestos probados 134 presentaban cierta actividad inhibitoria, pero solo 9 consiguieron inhibir más de un 20% la liberación de calcio inducida tras la estimulación plaquetaria con 3 µg/mL de CRP. Seis de estos 9 compuestos inhibieron la liberación de calcio menos del 30%, 1 inhibió en torno a un 30-35% y 2 consiguieron inhibir dicha liberación en un 50-60%. Para evaluar más a fondo la capacidad inhibitoria de estos 9 compuestos, se realizaron curvas dosis-respuesta utilizando concentraciones comprendidas entre 10^{-5} M y 10^{-10} M de los fármacos. Dos de ellos mostraron curvas lógicas de inhibición, sin embargo, a la hora de identificar dichos compuestos resultaron no ser específicos para la inhibición de GPVI, ya que inhibirían la activación plaquetaria inducida por cualquier otro agonista, además de actuar sobre otros tipos celulares. El primero de

estos compuestos resultó ser alprostadil (o prostaglandina E1, PGE1), cuyo mecanismo de actuación activando la adenilato ciclasa (AC) finaliza con el aumento de los niveles de AMPc y consecuentemente con la inhibición de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El otro de los compuestos, la milrinona, es un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa III que es quien se encarga de inhibir la conversión de ATP en AMPc. De este modo, la inhibición de la fosfodiesterasa III se traduce en un aumento de los niveles de AMPc que, de nuevo, tiene como consecuencia la disminución de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares inhibiendo finalmente la activación plaquetaria.

Debido al escaso éxito de la aproximación anterior, se planteó la realización de estudios de simulación computacional (análisis de acoplamiento *in silico*) utilizando de la estructura cristalina conocida de GPVI (PDB 2gi7 ID).[135] El estudio se encuentra actualmente en este punto, a la espera de los resultados del análisis *in silico* en el que se están probando aproximadamente 60000 compuestos procedentes de tres quimiotecas disponibles en el grupo con vistas a seleccionar posibles *hits* que serán validados mediante el protocolo miniaturizado de HTS que hemos puesto a punto.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. Discusión

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1 Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST

Uno de los trabajos principales que conforman la presente tesis doctoral es el estudio de las MVs del plasma de pacientes con IAMCEST. Este estudio constituye el primer análisis proteómico de las microvesículas del plasma de pacientes con un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, aportando información sobre potenciales biomarcadores del evento agudo y sentando las bases para futuros estudios en el campo. Se seleccionaron pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable como grupo control con el fin de focalizar los esfuerzos en el estudio de las diferencias asociadas a eventos aterotrombóticos. Estos controles tenían la misma medicación que los pacientes para evitar la influencia de los tratamientos antiplaquetarios, teniendo en cuenta que las MVs plaquetarias son el tipo más abundante de MVs en sangre humana.[320] Los controles fueron elegidos cuidadosamente de modo que no hubiese diferencias significativas con el grupo de pacientes agudos en las variables edad, sexo, tratamiento antiplaquetario y diabetes mellitus. Además se tuvo en especial consideración el tratamiento con estatinas, ya que se sabe que estos tratamientos reducen la liberación de MVs por parte de las plaquetas y del endotelio[321] (ver Tablas 5 y 7). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa, leucocitos y colesterol entre el grupo de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST que podrían estar asociadas a la patofisiología del evento agudo o a las condiciones estables (ver Tablas suplementarias 1 y 2). En los estudios de validación se incluyó además un grupo de controles sanos.

Previamente a la realización del análisis proteómico se realizaron numerosas pruebas utilizando diferentes protocolos publicados para obtener una población de MVs pura partiendo de 25 ml de sangre por paciente. Las preparaciones y mapas proteómicos de mayor calidad se obtuvieron utilizando el protocolo definido por Rammacciotti y colaboradores con pequeñas modificaciones,[317] el cual evita contaminaciones con células sanguíneas y proteínas plasmáticas.

Para el análisis proteómico por 2D-DIGE se eligió la región de pI 4-7 ya que, como se ha demostrado en estudios anteriores, en ese rango se concentra la mayor parte del proteoma de las microvesículas plaquetarias.[281] Los criterios de selección de las diferencias encontradas en el análisis proteómico fueron muy restrictivos: variaciones de intensidad de las manchas entre grupos ≥2 y valor $p<0,05$. El estudio proteómico reveló la existencia de 117 manchas con expresión diferencial entre ambas condiciones (ver Figura 18), lo que

demuestra que las MVs plasmáticas de pacientes con IAMCEST expresan un perfil proteico característico en comparación con las MVs del plasma de controles CROIAMCEST. El análisis por espectrometría de masas de las manchas proteicas diferencialmente reguladas llevó a la identificación de tan solo 25 ORFs (ver Tabla 6), poniendo de manifiesto la importancia de las modificaciones postraduccionales que sufren muchas de estas proteínas como es el caso de A2MG o fibrinógeno.

El análisis de biología de sistemas reveló que la mayoría de las proteínas identificadas estaban relacionadas con respuesta inflamatoria, trombosis, y enfermedad cardiovascular. Algunas de las proteínas identificadas como diferencialmente reguladas juegan un papel central en la activación de la vía clásica del sistema del complemento, y están implicadas en la respuesta inflamatoria (ej. complemento C3 y C4a); otras son importantes en el mantenimiento de la hemostasia y participan en la activación de las plaquetas, coagulación de la sangre y formación de trombos (ej. factor de von Willebrand, fibrinógeno, fibronectina, α2-macroglobulina y protrombina). El análisis de biología de sistemas reveló que 11 de estas proteínas se encuentran en redes relacionadas con infarto y 10 en redes relacionadas con aterosclerosis (ver Figura 21).
Es importante destacar que varias de las proteínas identificadas están involucradas en la trombogénesis, lo que indica que las MVs pueden estar jugando un papel relevante a nivel local en los eventos aterotrombóticos que conducen a un infarto de miocardio. Esto está en línea con los últimos datos del grupo de Lina Badimon que demuestran que las MVs de origen plaquetario podrían contribuir a la formación de trombos en las placas ateroscleróticas.[322] Por otro lado, es bien conocido que los procesos de trombosis e inflamación están interrelacionados, ya que durante un infarto las MVs son reclutadas al lugar de la lesión inflamatoria y desempeñan un papel importante en la modulación de la aterotrombosis. Cabe destacar que muchas de las proteínas identificadas en el presente estudio también se encontraron diferencialmente reguladas en MVs de pacientes con trombosis venosa profunda,[317] lo que refuerza la importancia de las MVs en los eventos aterotrombóticos que conducen a un IAMCEST. Algunas de estas proteínas incluyen proteínas del sistema del complemento, proteínas relacionadas con la activación de las plaquetas (vWF, fibrinógeno, fibronectina), inmunoglobulinas y A2MG. Esta coincidencia entre ambos estudios refuerza la relevancia de los datos aquí presentados.

Los estudios de validación se centraron en dos proteínas con isoformas altamente representadas en el análisis proteómico y con interés potencial como biomarcadores para el IAMCEST: alfa-2 macroglobulina (A2MG) y fibrinógeno. Además, se validó la viperina

(*Radical S-adenosyl methionine domain containing 2,* RSAD2) por su potencial interés a pesar de estar presente en una sola mancha en el análisis.

Alfa-2 macroglobulina es una glicoproteína inhibidora de proteinasas presente en el plasma humano que se puede unir covalentemente a éstas sin afectar a su actividad. Desempeña un papel importante en la trombogénesis y fibrinólisis, como se ha mencionado anteriormente, funcionando de hecho como un inhibidor de la fibrinólisis mediante la inhibición de la plasmina y calicreína. El análisis proteómico reveló la presencia de 23 manchas proteicas correspondientes a A2MG sobreexpresadas en pacientes con IAMCEST, indicando el papel relevante que podrían estar jugando las MVs en la aterotrombosis. Más en concreto, se encontró que la mayoría de esas manchas se correspondían con fragmentos proteolíticos de la proteína de entre 70 y 110 kDa. En relación con esto, se ha descrito que la formación de complejos A2MG-proteinasa conduce a la escisión específica de la región cebo (*bait region*) con la consecuente aparición de fragmentos de 85 a 90 kDa y más pequeños.[323] Además se ha sugerido que el aumento de la oxidación de los inhibidores de proteinasas podría contribuir a aumentar los niveles de proteólisis durante la inflamación severa, e incluso se ha observado un aumento de los fragmentos proteolíticos de A2MG en pacientes con pancreatitis aguda grave o letal.[323] En el presente estudio se ha detectado un aumento en los niveles de fragmentos proteolíticos de la proteína (ver Tabla 6), por lo que se especula que la inflamación severa asociada con un IAMCEST podría ser también la razón de la sobreregulación de dichos fragmentos y que la intensidad de dicha regulación podría ser un indicador de la gravedad del evento. Estos resultados fueron confirmados en un grupo independiente de pacientes mediante inmunodetección en geles bidimensionales, mostrando un claro aumento en la expresión de las isoformas de menor peso molecular en pacientes con IAMCEST, en comparación con controles crónicos y donantes sanos (ver Figura 19A). Como dato adicional es importante destacar que se ha descrito la sobreregulación de A2MG en MVs del plasma de pacientes con trombosis venosa profunda,[317] reforzando la importancia de las MVs en los eventos aterotrombóticos que conducen a un IAMCEST. Se necesitan más investigaciónes para probar esta teoría, estudiando específicamente esta proteína en las MVs plasmáticas de una cohorte más grande de pacientes.

El fibrinógeno es el precursor plasmático de la proteína estructural fibrina, la cual proporciona el soporte mecánico para la coagulación sanguínea. La conversión del fibrinógeno en fibrina por la acción de la enzima trombina es el paso final de la cascada de coagulación sanguínea. Esta glicoproteína de 340 kDa tiene una estructura multimérica formada por cadenas de polipéptidos α, β y γ. El análisis proteómico detectó una regulación

diferencial de las tres cadenas polipeptídicas (ver Tabla 6). La cadena γ es de especial interés ya que contiene múltiples epítopos que interactúan con las integrinas y juega un papel crítico en la agregación plaquetaria, la inflamación y la cicatrización de heridas.[324] Esta proteína fue detectada en 29 manchas protéicas, 26 de las cuales estaban sobrerreguladas en las MVs de pacientes con IAMCEST (ver Tabla 6), resultado que fue confirmado por inmunodetección en geles monodimensionales en un grupo independiente de pacientes (ver Figura 19B). La sobrerregulación de la cadena γ del fibrinógeno en pacientes con IAMCEST sugiere que las MVs participan en la agregación plaquetaria excesiva responsable de eventos aterotrombóticos, además de participar en la inflamación. En esta línea, cabe mencionar que se ha demostrado la presencia de fibrinógeno en MVs derivadas de las plaquetas y, curiosamente, también se encontró sobrerregulado en la superficie de micropartículas del plasma en un modelo experimental de trombosis venosa.[325]

La viperina es una proteína antiviral capaz de inhibir un amplio rango de virus de ADN y ARN, y es al mismo tiempo inducible por virus. El análisis proteómico realizado reveló la presencia de viperina en una mancha proteica sobrerregulada en MVs de pacientes con IAMCEST, aunque el análisis por espectrometría de masas también identificó la presencia de la cadena γ de fibrinógeno en la misma mancha (ver Tabla 6). Debido a su potencial interés, se decidió estudiar el estado de esta proteína por inmunodetección en geles monodimensionales, y los resultados confirmaron la presencia de la viperina en MVs del plasma y su sobrerregulación en pacientes con IAMCEST (ver Figura 19B). Dado que el peso molecular teórico de la proteína es de 42 kDa y que la banda detectada en la inmunodetección se encuentra en la región de 40 kDa, está claro que la mancha proteica detectada en el análisis 2D-DIGE de unos 22 kDa (ver Anexo III, Tabla suplementaria 9) es un fragmento proteolítico. Por lo tanto, debe haber otras manchas correspondientes a esta proteína que no hayan sido identificadas en el análisis 2D-DIGE, probablemente debido a que caen fuera del rango de pI estudiado (pI teórico de la viperina: 8,53). La viperina se expresa en aterosclerosis y su expresión es inducida en las células vasculares por estímulos inflamatorios y por infección con citomegalovirus (CMV). Se ha descrito la presencia de viperina en el endotelio de las lesiones ateroscleróticas humanas pero no en otros tipos de células o en las arterias normales,[326] lo que sugiere que la viperina presente en las MVs procede probablemente de células endoteliales. La detección de viperina en las lesiones ateroscleróticas puede estar asociada a CMV, pero también a un estado de inmunidad activa en la lesión. Es esencial profundizar en el estudio de la importancia de esta proteína en el contexto de la aterosclerosis e infarto de miocardio, por lo que se hace necesaria la realización de nuevos estudios al respecto.

En cuanto a las limitaciones del estudio de microvesículas cabe destacar que los pacientes incluidos en el estudio estaban sometidos a tratamiento, lo que por razones obvias era inevitable. Este problema se trató de solventar incluyendo controles crónicos con la misma medicación, además de un grupo de donantes sanos en las validaciones. Otra limitación fue el pequeño volumen de sangre disponible por paciente, lo que obligó a la utilización de *pools* para realizar el análisis proteómico y supuso un impedimento a la hora de realizar más estudios relacionados con las proteínas identificadas. Por último cabe mencionar las limitaciones inherentes a la propia 2-DE, tales como la posible infrarrepresentación de proteínas muy hidrofóbicas, de proteínas muy básicas/ácidas y de proteínas de alto peso molecular. Aunque en este caso el análisis 2D-DIGE permitió la identificación de diferencias debidas a PTMs, un análisis obviando geles, tipo *shotgun*, aportaría sin duda valiosos datos adiconales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo

El estudio de las plaquetas arteriales de pacientes IAMCEST en contacto directo con el trombo constituye el primer análisis del proteoma de plaquetas procedentes de la arteria coronaria obstruida en este tipo de pacientes. Dicho análisis reveló la existencia de diferencias significativas entre plaquetas arteriales en contacto con el trombo y plaquetas arteriales periféricas de los mismos pacientes. De este modo cada paciente es su propio control, minimizando así las diferencias biológicas. La estrategia utilizada para la extracción de la muestra coronaria consistió en la utilización de un catéter que obstruye el flujo sanguíneo anterógrado, permitiendo así la recolección de la sangre distal en contacto directo con el trombo.[327,328] La sangre periférica fue obtenida de la arteria por la cual se introdujo el catéter en el momento de la reperfusión, y siempre en primer lugar para evitar contaminaciones con sangre coronaria.

El análisis proteómico diferencial realizado por 2D-DIGE detectó la presencia de 16 manchas proteicas reguladas de forma diferencial entre ambas condiciones de estudio (ver Figura 22) correspondientes a 15 proteínas únicas, en su mayoría relacionadas con el citoesqueleto y funciones de transducción de señales (ver Tabla 9). Once de las manchas se encontraron sobrerrepresentadas en muestras intracoronarias, mientras que 5 se encontraron infrarrepresentadas. Aunque la mayoría de las variaciones son probablemente debidas a modificaciones postraduccionales, no se puede descartar la síntesis de proteínas *de novo* como se explicará más abajo. El rango de pI utilizado fue 4-7 ya que en estudios anteriores habíamos demostrado que más del 85% del proteoma de plaquetas se encuentra dentro de ese rango,[248] y geles grandes para aumentar la resolución del análisis. Los criterios de selección de las diferencias encontradas en el análisis proteómico fueron variaciones de intensidad de las manchas entre grupos ≥1,2 y valor $p<0,05$.

De entre las proteínas identificadas se seleccionaron para los estudios de validación la integrina αIIb (ITA2B), el adaptador *Src kinase-associated fosfoprotein 2* (SKAP2), la proteína de citoesqueleto talina-1 y la proteína glicoadhesiva trombospondin-1 (TSP-1), por el papel relevante que todas ellas desempeñan en los eventos de activación plaquetaria. En algunos casos se realizaron inmunodetecciones en geles bidimensionales para estudiar no sólo las variaciones de proteínas en general, sino también cambios en las isoformas debidos a modificaciones postraduccionales.

La integrina αIIb es una proteína de membrana que forma parte del receptor de membrana heterodimérico αIIbβ3 (GPIIb-IIIa). Este receptor es la única integrina expresa solamente en plaquetas, y es necesario para la agregación normal de las plaquetas y la adhesión al endotelio. Esta proteína tiene un número de copias estimado de 83.300 por plaqueta,[308] siendo una de las proteínas más abundantes en las plaquetas (dentro del 1,2% más abundante). Por otra parte, Simon y colaboradores determinaron recientemente que el ARNm que codifica para la integrina αIIb también es muy abundante en plaquetas (dentro del 5% más abundante) (ver www.plateletomics.com).[329] Además, la síntesis αIIb en las plaquetas circulantes ha sido demostrada por Kieffer y colaboradores.[9] El análisis proteómico mostró la existencia de tres manchas proteicas sobrerreguladas en muestras intracoronarias correspondientes a αIIb (ver Tabla 9), cuyos valores teóricos y experimentales de peso molecular y pI eran muy similares (ver AnexoIII, Tabla suplementaria 10). Las inmunodetecciones realizadas en muestras individuales confirmaron una sobreregulación general de esta proteína en las plaquetas intracoronarias (ver Figura 23A). Con todo ello en mente, la síntesis proteica en respuesta a la activación plaquetaria en el lugar de la lesión parece una explicación bastante razonable, aunque no la única. A pesar de que se trató de detectar diferencias en isoformas de la proteína, las manchas en el gel se encontraban demasiado próximas o la resolución de los minigeles en los que se realizó la inmunodeteccion no era lo suficientemente grande.

La proteína adaptadora SKAP2 está relacionada con la vía de Src, la remodelación del citoesqueleto de actina y la regulación de la correcta activación del sistema inmune, probablemente mediante el control del *cross-talk* entre inmunorreceptores e integrinas. Además, existen evidencias de que SKAP2 (presumiblemente en cooperación con el adaptador citosólico ADAP) está implicada en la regulación de la adhesión de leucocitos.[330] Se ha estimado que el número de copias de SKAP2 por plaqueta es de unas 6.800,[308] siendo una de las proteínas más abundantes (dentro del 12,3% más abundante). Se sabe además que el ARNm que codifica para esta proteína está dentro del 4% más abundante en las plaquetas (ver www.plateletomics.com).[329] El análisis proteómico reveló la existencia de una única mancha proteica correspondiente a SKAP2 sobreexpresada en muestras intracoronarias (ver Tabla 9), con valores teóricos de peso molecular y pI bastante cercanos a los experimentales (ver AnexoIII, Tabla suplementaria 10). Las inmunodetecciones en muestras individuales confirmaron este resultado (ver Figura 23B). Como en el caso de ITA2B, podría haber varias razones para esta diferencia, tales como la existencia de otras manchas diferencialmente reguladas no detectadas en el análisis. Sin embargo, la consistencia entre los datos del análisis proteómico y de las validaciones, y la proximidad

entre los valores teóricos y experimentales de peso molecular y pI, hacen pensar que la explicación más probable es de nuevo la síntesis de proteínas en respuesta a la activación de las plaquetas en el lugar de la lesión coronaria.

A pesar de la falta de un núcleo, la síntesis proteica en las plaquetas ha sido estudiada durante décadas.[244] Lindemann y colaboradores demostraron la existencia de una traducción de proteínas constitutiva en las plaquetas, y que este proceso continúa durante horas después de la estimulación con trombina o de la adhesión mediada por integrina.[331] Como se ha mencionado, Kieffer y colaboradores demostraron la síntesis de αIIb en plaquetas circulantes.[9] Por otra parte, nuestro grupo ha descrito recientemente una sobrerregulación del adaptador Crk-L en plaquetas de pacientes con IAMCEST en comparación con controles CROIAMCEST.[175] En una publicación reciente, Ramaiola y colaboradores han informado de que el proteoma del trombo intracoronario de pacientes con IAMCEST varía con la edad del trombo, afectando especialmente a las proteínas del citoesqueleto.[332] En conjunto, todos estos datos respaldan la posibilidad de considerar la síntesis de proteínas como una de las opciones, junto con las PTMs, para explicar las diferencias detectadas en los niveles de expresión de ciertas proteínas plaquetarias el lugar de la lesión.

Trombospondin-1 es una proteína de adhesión liberada por los gránulos α tras la activación plaquetaria. Esta gran glicoproteína se compone de tres subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro con un peso molecular aproximado de 180 kDa en condiciones reducidas.[333] La activación plaquetaria desencadena la proteólisis de la proteína originando varias isoformas de la misma, de modo que existen isoformas de 165 kDa e incluso más pequeñas.[333] El análisis proteómico reveló la existencia de 6 manchas proteicas sobrerreguladas en muestras intracoronarias correspondientes a TSP-1, todas ellas en un área de unos 120 kDa, (ver Tabla 9). Las inmunodetecciones en geles bidimensionales mostraron una tendencia al aumento en los niveles de las isoformas comprendidas entre 120 y 140 kDa de TSP-1 en plaquetas intracoronarias (ver Figura 24), en línea con los resultados del estudio proteómico. Aunque la cuantificación es difícil debido al gran número de isoformas y a la falta de resolución de los minigeles 2D, la tendencia parece clara. Es interesante destacar que nuestro grupo ha descrito recientemente que las isoformas proteolíticas de TSP-1 en el mismo intervalo de pesos moleculares que se muestra aquí, se encuentran también sobrerreguladas en plaquetas de sangre venosa de pacientes con IAMCEST en comparación con controles CROIAMCEST.[175] Los datos obtenidos en el estudio actual refuerzan los resultados previos detectados en sangre venosa y destacan la

importancia del estudio de los eventos de activación de plaquetas en el lugar de la lesión arterial. La secreción de TSP-1 en el lugar de la lesión podría ser responsable de regular las interacciones celulares y promover la reorganización de la matriz extracelular.[334]

Talina-1 es una proteína de citoesqueleto que juega un papel fundamental en la activación y agregación de las plaquetas. Es una proteína esencial para la activación de la integrina β3 que forma parte del complejo αIIbβ3. Dicha activación sucede tras la unión del dominio de unión a fosfotirosina de la talina y la cola de la integrina β3.[335] El análisis proteómico 2D-DIGE detectó la presencia de talina-1 en una única mancha proteica disminuida en plaquetas intracoronarias (ver Tabla 9), pero dicha mancha se encontraba en una zona de pI y peso molecular muy alejada de sus valores teóricos (ver AnexoIII, Tabla suplementaria 10). Teniendo en cuenta que la principal isoforma de la talina tiene un peso molecular teórico elevado (271 kDa), se decidió realizar inmunodetecciones en geles monodimensionales. El resultado no reveló la existencia de ninguna diferencia entre las muestras a comparar (ver Figura 24), lo que sugiere que la mancha detectada en el análisis proteómico correspondía a una PTM, muy probablemente a una forma proteolizada de la talina originada de forma natural por acción de la calpaína.[336] Aunque se necesita una investigación más extensa para explorar el interés de este hallazgo, su relevancia se ve reforzada por publicaciones anteriores. En este contexto, nuestro grupo ha descrito isoformas proteolíticas de talina-1 reguladas de forma diferencial al comparar las plaquetas de pacientes con SCA y controles con cardiopatía isquémica crónica estable[300] y por otro lado ha apuntado a la señalización de la integrina αIIbβ3 como una de las vías de plaquetas más relevantes que intervienen en el IAMCEST.[175] De este modo, los datos encontrados en el presente estudio refuerzan la importancia de la vía de señalización de αIIbβ3 en el IAMCEST.

En cuanto a las limitaciones del estudio de intracoronaria cabe destacar que los pacientes utilizados estaban inevitablemente sometidos a tratamiento. Sin embargo, al utilizar la sangre periférica de los mismos pacientes como control se evita que las diferencias detectadas sean causadas por el propio tratamiento. De todos modos los resultados aquí presentados deben considerarse con cautela y ampliar los estudios utilizando cohortes más grandes de pacientes. En cuanto al enfoque proteómico, la electroforesis bidimensional presenta limitaciones tales como la infrarrepresentación de proteínas muy hidrofóbicas, de proteínas muy básicas/ácidas y de proteínas de alto peso molecular. La limitación de la muestra fue también un problema para el diseño del estudio ya que idealmente, el estudio proteómico debería haber incluido réplicas biológicas y técnicas, pero la cantidad de muestra disponible por paciente lo impedía. En estas circunstancias, se decidió realizar

replicas técnicas en el análisis inicial 2D-DIGE y hacer validaciones en muestras biológicas en un grupo independiente de pacientes. De nuevo cabe mencionar que aunque el análisis 2D-DIGE realizado permitió la identificación de diferencias debidas a PTMs, un análisis tipo *shotgun* aportaría sin duda valiosos datos adicionales.

5.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI

Por todo lo explicado en el apartado 1.2.4 de la introducción, la glicoproteína GPVI es considerada una diana antitrombótica prometedora en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, proporcionando una buena relación entre el riesgo de sangrado y el beneficio antitrombótico derivados de su inhibición.[168] Además, nuestro grupo analizó recientemente el proteoma de las plaquetas de pacientes con SCA,[175,300] con especial énfasis en pacientes con IAMCEST, conduciendo a la identificación de una serie de proteínas de la vía de señalización de GPVI, entre otras, alteradas en el evento agudo.[175] Por este motivo se eligió un doble enfoque para analizar los niveles de activación de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas de los pacientes con IAMCEST, utilizando por un lado plaquetas de sangre venosa y por otro plaquetas de sangre aterial.

Con el fin de proporcionar nuevas pistas sobre el grado de implicación de la cascada de señalización de GPVI en el evento agudo, se realizó un estudio en plaquetas de sangre venosa de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Como grupo control se seleccionaron pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable. Al igual que en los estudios anteriores, los controles fueron elegidos cuidadosamente de modo que no hubiese diferencias significativas con el grupo de pacientes agudos en edad, sexo, tratamiento antiplaquetario y diabetes mellitus.

Se realizó una primera aproximación utilizando un pequeño grupo de pacientes y controles para analizar el estado de activación de la vía de GPVI en las plaquetas de sangre venosa de pacientes con IAMCEST. Esta aproximación consistió en la realización de un análisis proteómico a pequeña escala por 1D SDS-PAGE para seleccionar un panel de biomarcadores de activación de GPVI que podrían ser validados en cohortes más grandes de pacientes. El análisis proteómico se basó en la inmunoprecipitación de las proteínas fosforiladas en tirosina tras la activación de las plaquetas de pacientes y controles con el agonista específico de GPVI, *collagen-related peptide* (CRP), en condiciones no agregantes y en presencia de inhibidores de los mediadores secundarios. El análisis proteómico diferencial reveló la existencia de 7 bandas con mayor intensidad en el carril correspondiente a las plaquetas de pacientes con IAMCEST (ver Figura 25A), cuyo análisis por espectrometría de masas llevó a la identificación de 24 proteínas únicas (ver Tabla 12). Entre las proteínas identificadas se incluyen varias proteínas de señalización GPVI bien conocidas como son la tirosina quinasa Syk, los adaptadores SLAP-130 y GADS, el enzima PLCγ2, la proteína transmembrana de tipo I G6f, y los adaptadores Dok-2, GADS, SLAP-130, y SLP-76. La inmunodetección de las

proteínas pTyr realizada en paralelo, utilizando lisados de plaquetas enteras, reveló una sobrerregulación de la vía de señalización de GPVI en respuesta a al CRP en pacientes con IAMCEST, reflejado por un aumento general en los niveles de pTyr (ver Figura 25B).

De entre las proteínas identificadas se seleccionaron para los estudios de validación la enzima fosfolipasa C gamma 2 (PLCγ2), el adaptador SLP76, la proteína adaptadora Dok-2 y la proteína transmembrana de tipo I, G6F. Las validaciones por inmunodetección de estas proteínas realizadas en un grupo más amplio de pacientes tras la activación plaquetaria con CRP y la inmunoprecipitación del proteoma resultante con el anticuerpo monoclonal anti pTyr 4G10, confirmaron que sus niveles generales de pTyr estaban incrementados en pacientes con IAMCEST en comparación con los controles.

La enzima fosfolipasa C gamma 2 (PLCγ2) es clave para la producción de segundos mensajeros en respuesta a la activación plaquetaria por colágeno.[168] La proteína adaptadora Dok-2 participa en la señalización de GPVI[249] siendo fosforilada principalmente por la quinasa Lyn. La proteína transmembrana de tipo I, G6F, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas ha sido previamente identificada por nuestro grupo revelando su fosforilación específica en el residuo Tyr-281 en respuesta a la activación de GPVI, proporcionando un lugar de acoplamiento para el adaptador Grb2.[14] Los estudios de inmunodetección de estas tres proteínas han confirmado un aumento estadísticamente significativo en sus niveles de pTyr en pacientes con IAMCEST (ver Figuras 26A, C y D). En el caso del adaptador SLP76 que interactúa con PLCγ2 para regular positivamente la señalización de GPVI,[168] el resultado de la inmunodetección mostró una clara tendencia al aumento de sus niveles de pTyr en plaquetas de pacientes con IAMCEST, pero dicha tendencia no llegaba a tener significación estadística (ver Figura 26B).

El incremento del número de receptores GPVI en la membrana de plaquetas de pacientes con IAMCEST podría ser una buena explicación para el aumento observado en la activación de la vía de señalización de GPVI en respuesta a CRP, lo que explicaría por qué las plaquetas de pacientes con IAMCEST se activan más fácilmente a través de GPVI que las plaquetas de los controles. Los estudios publicados en los últimos años por el grupo de Bigalke demostraron que la expresión de GPVI se encuentra elevada en las plaquetas de pacientes con SCAs.[169,170,172] A pesar de la existencia de una capacidad de síntesis proteica limitada por parte de las plaquetas en respuesta a estímulos inflamatorios y protrombóticos,[337,244] el aumento de la expresión de GPVI en la superficie de las plaquetas de pacientes con SCAs se debe muy probablemente a una redistribución del receptor desde el interior de las

plaquetas hacia la superficie, que sería activada por el evento agudo o su inminencia. Esta redistribución ha sido demostrada en plaquetas *in vitro* tras la activación de GPVI.[338] Una explicación alternativa para los resultados encontrados podría podría estar en línea con la teoría propuesta recientemente por el grupo de Loyau, quien encontró que la activación de las plaquetas con agonistas solubles o factor de von Willebrand induce un cambio en el receptor GPVI, pasando de la forma monomérica típica del estado de reposo a una forma dimérica con mayor afinidad por el colágeno. Además, este grupo observó que los antagonistas de $P2Y_{12}$ administrados a los pacientes con enfermedad coronaria limitaban la dimerización de GPVI inducida por ADP,[157] por lo que una inhibición insuficiente de este receptor podría ser responsable del mecanismo de cebado causando niveles más altos de activación de GPVI. Sin embargo, en el presente estudio todos los pacientes fueron tratados con antagonistas de $P2Y_{12}$, poniendo especial énfasis en evitar diferencias en el tratamiento antiplaquetario entre los grupos de pacientes y controles, por lo que la teoría de la redistribución del GPVI interno hacia la superficie de las plaquetas parece una explicación más convincente.

Como prueba de validación adicional se realizaron ensayos de agregación plaquetaria utilizando agonistas de GPVI (colágeno y CRP), y los resultados mostraron un aumento en los niveles de agregación en plaquetas de pacientes con IAMCEST en respuesta a ambos agonistas, en comparación con los controles (ver Figura 27). Esto sugiere una mayor activación de la vía de señalización de GPVI en los pacientes, de acuerdo con nuestros datos proteómicos y de inmunodetección. Es interesante mencionar que, como hemos demostrado en otro de los estudios que conforman esta tesis doctoral, GPVI es el principal responsable de la agregación plaquetaria por colágeno[280] por lo que la similitud encontrada entre la agregación resultante de la activación con CRP y colágeno tiene sentido.

Para explorar más a fondo la participación de GPVI en la activación plaquetaria asociada con el IAMCEST se analizaron los niveles de pTyr de los cuatro biomarcadores encontrados en el estudio anterior, utilizando en este caso plaquetas procedentes de sangre intracoronaria del lugar de la lesión. La comparativa se realizó entre sangre obtenida de la arteria coronaria extraída del lugar del daño (es decir, en contacto directo con el trombo) y plaquetas tomadas de una arteria periférica. Este enfoque fue utilizado en estudios anteriores permitiendo la detección de biomarcadores de activación plaquetaria en la sangre intracoronaria. Por ejemplo, Gresele y colaboradores describieron recientemente la liberación de metealloproteinasa-2 en la circulación coronaria de los pacientes con SCAs por parte de las plaquetas como consecuencia de su activación.[339] Además, los resultados del estudio clínico

de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo incluidos en la presente tesis doctoral, demuestran una sobreregulación de las proteínas implicadas en la activación plaquetaria en plaquetas de la arteria coronaria de pacientes con IAMCEST.[340] Por lo tanto, el estudio de la circulación coronaria y, más precisamente, de lo que sucede en el lugar de la lesión, puede aportar pistas sobre los receptores plaquetarios que podrían estar jugando un papel relevante en el evento agudo. Por otro lado, el estudio de plaquetas intracoronarias podría ser relevante para el tratamiento de los SCAs como han demostrado Desch y colaboradores al encontrar que una inyección directa de abciximab en la arteria coronaria resulta en una inhibición local más pronunciada de la función plaquetaria en pacientes con IAMCEST en comparación con la inyección intravenosa estándar.[341]

Al probar el panel de biomarcadores propuestos en las plaquetas de sangre arterial de pacientes con IAMCEST se encontraron niveles más altos de las formas pTyr de las cuatro proteínas estudiadas en respuesta a CRP en las plaquetas de la arteria coronaria, lo que se podría traducir en un aumento de la pTyr total. Esto sugiere que el nivel de expresión de GPVI en la superficie de las plaquetas podría ser aún mayor si se mide en las plaquetas de sangre intracoronaria. De este modo, el estudio aquí planteado podría asemejarse a la realización de una *zoom* en el lugar de la lesión al estudiar las plaquetas en contacto directo con el trombo en el lugar de la oclusión, lo que de alguna manera permite observar mejor los acontecimientos bioquímicos relacionados con el evento agudo.

En este caso se detectó un aumento significativo de los niveles de pTyr de las proteínas SLP76, Dok-2 y G6f en las plaquetas en contacto con el trombo (ver Figuras 28B, C y D), mientras que dicho aumento no llegó a ser significativo en el caso de PLCγ2 (ver Figura 28A) debido probablemente al bajo número de muestras utilizado. Es importante destacar que en este estudio cada paciente es su propio control. Como es de esperar, las diferencias en los niveles de pTyr detectadas en este caso son menos acentuadas que cuando se comparan las plaquetas de sangre venosa de pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST, ya que en el último caso se trata de dos grupos de pacientes diferentes. Estos resultados abren una nueva línea de investigación y refuerzan los datos del estudio realizado en sangre venosa, sugiriendo con fuerza el papel relevante de la señalización de GPVI en la activación de las plaquetas durante el IAMCEST.

5.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI

Las estrategias actuales para la gestión del riesgo cardiovascular causado por la agregación no deseada de las plaquetas dependen en gran medida del uso combinado de aspirina e inhibidores del receptor de ADP, $P2Y_{12}$. Entre los inhibidores de $P2Y_{12}$, el clopidogrel se ha venido utilizando rutinariamente durante más de una década para el tratamiento de pacientes con SCA, pero su eficacia se ve obstaculizada principalmente por la variabilidad individual en la respuesta que depende de diversos factores. Los nuevos inhibidores de este receptor como el prasugrel y el ticagrelor han demostrado ser más eficaces para prevenir la recurrencia de eventos coronarios agudos[316,342] originando una inhibición de la agregación plaquetaria más intensa y rápida. En aquellos pacientes con SCAs que presentan mayor riesgo de experimentar eventos subsecuentes, como es el caso de los pacientes con IAMCEST y de pacientes con un diagnóstico de diabetes en los que la probabilidad de resistencia al clopidogrel es mayor,[343,344] las características farmacológicas del ticagrelor y del prasugrel los hacen opciones preferibles.[314,315,345,346] Por su parte, los inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa (abciximab, epifibatide, tirofiban) son utilizados en clínica para reducir el desarrollo del trombo en los pacientes de riesgo que van a ser sometidos a intervencionismo coronario. El uso de abciximab en pacientes con IAMCEST sometidos a revascularización por una intervención coronaria percutánea mejora la microcirculación coronaria y reduce los eventos adversos graves en determinados pacientes de alto riesgo, reduciendo las tasas de insuficiencia cardíaca.[347] Las directrices actuales recomiendan el uso selectivo de abciximab en pacientes con un alto riesgo de eventos isquémicos (infarto grande en la pared anterior, gran carga trombótica) y/o complicaciones de la intervención coronaria primaria, especialmente en pacientes con un bajo riesgo de hemorragia.[348] A pesar de que estos fármacos son eficaces en un gran número de personas, presentan limitaciones como son el aumento del riesgo de sangrado y la resistencia a los medicamentos. De este modo se ha evidenciado una gran necesidad de avanzar en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiplaquetarios más seguros y eficaces, como podrían ser fármacos inhibidores de la vía de señalización de GPVI para la cual todavía no existen medicamentos en el mercado.

En los últimos años se han publicado numerosos estudios que evidencian el interés del receptor GPVI como diana terapéutica prometedora en el tratamiento de los SCAs,[165,166,183,349-351] incluyendo los estudios de la vía de GPVI en pacientes con IAMCEST realizados en la presente tesis[340] (Vélez et al., enviado a publicar). En la actualidad se asume que la inhibición o el bloqueo del receptor de GPVI podrían limitar el crecimiento del trombo arterial favoreciendo así su eliminación natural o terapéutica. Su inhibición supondría

beneficios clínicos tales como una elevada eficacia en la inhibición de la trombosis coronaria y un bajo riesgo de hemorragia, contribuyendo a conseguir el objetivo terapéutico de controlar el delicado equilibrio entre el riesgo hemorrágico y el riesgo isquémico. Por ello en la presente tesis doctoral se ha abordado el estudio de la inhibición de GPVI realizando tres aproximaciones, y utilizando en todos los casos plaquetas obtenidas de donantes sanos.

Por un lado, se trató de evaluar la eficacia del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 (Fab-OM2) en la inhibición de la agregación y activación plaquetaria inducidas por la activación del receptor GPVI. Los resultados de los estudios de agregación mostraron es la minima dosis de Fab-OM2 capaz de inhibir por completo la agregación inducida por CRP 5 µg/mL es de 1 µg/mL (Figura 30A). La inclusión de trombina y *rhodocytin* en el estudio a modo de control confirmó, además de la inhibición especifica de GPVI por parte de Fab-OM2, que la inhibición observada no se debe a un efecto tóxico que la dosis del inhibidor pudiese estar teniendo sobre las plaquetas (Figura 30B). Se realizó además un ensayo bioquímico de modulación de la inhibición de la activación inducida por CRP con diferentes dosis de Fab-OM2, determinando que la mínima dosis capaz de inhibir eficazmente la activación de GPVI inducida por CRP 5 µg/mL a nivel bioquímico es de 0,3 µg/mL (Figura 31B). Cabe mencionar que las diferencias detectadas en relación a la eficiencia inhibitoria de Fab-OM2 entre los ensayos de agregación y bioquímico se deben a la presencia de integrilina y de inhibidores de los mediadores secundarios en el último caso. Este estudio está todavía en curso, y el siguiente paso será evaluar *in vitro* el efecto que tiene este inhibidor en plaquetas de pacientes con IAMCEST, que como ya hemos demostrado tienen la vía de activación de GPVI sobrerregulada.

Por otra parte, utilizando inhibidores de los principales receptores de colágeno (α2β1 y GPVI) se confirmó que GPVI es el principal receptor responsable de la agregación/activación inducida por este agonista (ver Figura 32). Los resultados de la agregación inducida por dosis elevadas de colágeno revelaron que Fab-OM2 no consigue la inhibición completa de la agregación debido, seguramente, a la existencia de otros receptores del colágeno que estaban siendo activados en las plaquetas (ver Figura 32B). Sin embargo, en el caso de la agregación inducida por dosis mas bajas de colágeno Fab-OM2 consiguió inhibir la agregación aproximadamente en un 90%. Al evaluar el efecto de Fab-OM2 en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por CRP, los resultados mostraron una inhibición total de dicha agregación (ver Figura 32A), lo que pone de manifiesto la actuación especifica de Fab-OM2 sobre el receptor GPVI. La activación plaquetaria utilizando trombina en presencia de dosis elevadas de los inhibidores BTT-

3033 y Fab-OM2 descarta que las elevadas dosis de los inhibidores utilizadas pudieran estar teniendo un efecto tóxico sobre las plaquetas. Este resultado avala la importancia de avanzar en la búsqueda de inhibidores de la vía de señalización de GPVI para el tratamiento de los SCAs.

Por último se planteó la búsqueda de pequeñas moléculas capaces de inhibir específicamente GPVI mediante técnicas de cribado de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS) en combinación con estudios de simulación computacional. El objetivo es identificar un compuesto capaz de inhibir la activación y agregación de plaquetas por GPVI y también la formación de trombos en respuesta a colágeno en condiciones fisiológicas *in vitro*. Para ello se ha puesto a punto un protocolo de trabajo estandarizado y miniaturizado con el que poder evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre plaquetas activadas con CRP. Inicialmente se evaluó la actividad inhibitoria de 1120 compuestos procedentes de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick con escaso éxito debido a que los compuestos detectados como potenciales *hits* resultaron no ser específicos para la inhibición de GPVI, ya que conducen al aumento de los niveles de AMPc que consecuentemente disminuye los niveles de calcio intracelular.[352] De este modo, ambos compuestos serían eficientes en la inhibición de la activación plaquetaria inducida por cualquier otro agonista, además de actuar sobre otros tipos celulares. En la actualidad, se están realizando estudios de simulación computacional (análisis de acoplamiento *in silico*) con el fin de predecir el posible acoplamiento a GPVI de aproximadamente 60000 compuestos disponibles en el grupo. El siguiente paso será la validación de los *hits* que resulten positivos mediante ensayos de HTS, utilizando el protocolo miniaturizado de medición de la activación plaquetaria que hemos puesto a punto con anterioridad. Estos ensayos serán realizados en plaquetas de donantes sanos, y de confirmarse la inhibición especifica de la vía de señalización de GPVI por alguno de los *hits* se realizarán ensayos *in vitro* en plaquetas de pacientes con IAMCEST, que como ya hemos demostrado tienen la vía de activación de GPVI sobrerregulada. Además, la inhibición de estos compuestos será comparada con la inhibición inducida por Fab-OM2.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6.1 Estudio de las microvesículas del plasma de pacientes con IAMCEST

1. Se propone un protocolo estandarizado de alto rendimiento para la purificación de microvesículas plasmáticas para su posterior análisis proteómico. Así mismo, se demuestra su eficacia mediante análisis de las propias MVs y de su proteoma.

2. El estudio proteómico de alta resolución 2D-DIGE revela que las MVs plasmáticas de pacientes IAMCEST expresan un perfil proteico característico en comparación con las MVs del plasma de controles CROIAMCEST. Este estudio aporta información novedosa sobre cambios en las proteínas asociados al evento agudo y demuestra la utilidad de la proteómica en la caracterización de los cambios en perfil proteico que sufren las MVs del plasma durante el infarto.

3. El análisis comparativo de plaquetas de pacientes y controles permitió detectar 102 diferencias significativas correspondientes con 25 proteínas únicas, lo que pone de manifiesto la importancia de las modificaciones postraduccionales que sufren muchas de estas proteínas.

4. Se propone una lista de proteínas reguladas de forma diferencial entre las condiciones de estudio. Dichas proteínas podrían constituir una fuente prometedora de biomarcadores y dianas farmacológicas para el IAMCEST.

5. Varias de las proteínas identificadas están involucradas en la trombogénesis, incluyendo isoformas A2MG y fibrinógeno, lo que sugiere que las MVs podrían estar jugando un papel relevante a nivel local en los eventos aterotrombóticos que conducen a un infarto de miocardio. Esto requiere una investigación más detallada.

6. Los estudios de validación confirman que las diferencias detectadas en A2MG, fibrinógeno y viperina se deben a modificaciones postraduccionales producidas durante el evento agudo.

6.2 Estudio de las plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo

1. El estudio proteómico de alta resolución 2D-DIGE de plaquetas de pacientes con IAMCEST obtenidas de sangre arterial en contacto con el trombo revela la existencia de 16 diferencias significativas correspondientes a 15 proteínas únicas. Entre ellas se encuentran proteínas relevantes para los eventos de activación plaquetaria como la integrina αIIb (ITA2B), el adaptador Src kinase-associated fosfoprotein 2 (SKAP2), la proteína de citoesqueleto talina-1 y la proteína glicoadhesiva trombospondin-1 (TSP-1),

2. Los estudios de validación confirman la sobreregulación de ITA2B, de SKAP2 y de las isoformas proteolíticas de TSP-1 en plaquetas procedentes de la arteria intracoronaria ocluida, y se propone que las diferencias detectadas pueden deberse a modificaciones postraduccionales o a la síntesis limitada de proteínas en respuesta a la activación plaquetaria y a la inflamación que suceden en el lugar de la lesión arterial.

3. Este estudio abre una nueva línea de investigación para explorar más a fondo el papel fisiopatológico de las plaquetas en el IAMCEST.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 Estudios de la vía de señalización de GPVI

1. El estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI en plaquetas procedentes de sangre venosa revela que dicha vía se encuentra sobreactivada en pacientes con IAMCEST.

2. Se demuestra que las plaquetas en contacto directo con el trombo presentan mayores niveles de activación de la vía de señalización de GPVI que aquellas alejadas del lugar del daño.

3. Se propone una lista de potenciales biomarcadores del evento agudo.

4. Se propone que la externalización de GPVI desde el interior de las plaquetas hacia la membrana a consecuencia del evento agudo o su inminencia, es el mecanismo que mejor explica la activación observada.

5. Se propone una aproximación interesante basada en la comparativa de plaquetas en contacto directo con el trombo y plaquetas periféricas para evaluar qué sucede en el lugar de la lesión vascular causante del infarto. Esto aportará pistas sobre los mecanismos plaquetarios que podrían estar jugando un papel relevante en el evento agudo.

6. Se confirman el receptor GPVI y su vía de señalización como objetivos antitrombóticos prometedores para el infarto de miocardio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.4 Estudios de inhibición de la vía de señalización de GPVI

1. Se confirma que GPVI es el principal receptor responsable de la agregación inducida por colágeno.

2. Se confirma la eficacia del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal OM2 (Fab-OM2) en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y por CRP.

3. Se ha puesto a punto un protocolo miniaturizado para evaluar la activación plaquetaria mediante técnicas de cribado de alto rendimiento y actualmente se está realizando una búsqueda de pequeñas moléculas capaces de inhibir eficazmente la activación plaquetaria a través del receptor de colágeno GPVI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

[1] **Schultze M.** Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch Mikrosk Anat* 1865;1:1-42.

[2] **Bizzozero J.** Ueber einen neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1882;90:261-332.

[3] **Warshaw AL, Laster L, Shulman N**R. The stimulation by thrombin of glucose oxidation in human platelets*. J Clin Invest* 1966;45(12):1923-34.

[4] **Warshaw AL, Laster L, Shulman NR.** Protein synthesis by human platelets*. J Biol Chem* 1967;242(9):2094-7.

[5] **Booyse FM, Rafelson ME Jr.** In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets. *Nature* 1967;215:283-4.

[6] **Booyse FM, Rafelson ME Jr.** Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1967;145(1):188-90.

[7] **Booyse FM, Rafelson ME Jr.** Studies on human platelets: I. Synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 1968;166:689-97.

[8] **Schneider W, Dries R, Kulenkampff G.** Studies on the protein and nucleic acid synthesis of normal human blood platelets. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1972;53:113-7.

[9] **Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J.** Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 1987;164:189-95.

[10] **Bruce IJ, Kerry R.** The effect of chloramphenicol and cycloheximide on platelet aggregation and protein synthesis. *Biochem Pharmacol* 1987;36:1769-73.

[11] **Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA.** Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5556-61.

[12] **Zimmerman GA, Weyrich AS.** Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s17-24.

[13] **Maguire PB, Wynne KJ, Harney DF, O'Donoghue NM, Stephens G, Fitzgerald DJ.** Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics* 2002;2:642-8.

[14] **García A, Senis YA, Antrobus R, Hughes CE, Dwek RA, Watson SP, Zitzmann N.** A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling

proteins in GPVI-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* 2006;6:5332-43.

[15] **Fritz E, Ludwig H, Scheithauer W, Sinzinger H.** Shortened platelet half-life in multiple myeloma. *Blood* 1986;68(2):514-20.

[16] **Stegner D, Nieswandt B.** Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:109-21.

[17] **Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM.** Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):2-16.

[18] **Batar P, Dale GL.** Simultaneous engagement of thrombin and Fc gamma RIIA receptors results in platelets expressing high levels of procoagulant proteins. *J Lab Clin Med* 2001;138(6):393-402.

[19] **Alberio LJ, Clemetson KJ.** All platelets are not equal: COAT platelets. *Curr Hematol Rep* 2004;3(5):338-43.

[20] **London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN.** A Subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J Biol Chem* 2004;279:19854-9.

[21] **Kulkarni S, Jackson SP.** Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIbbeta3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem* 2004;279:30697-706.

[22] **Prodan CI, Vincent AS, Padmanabhan R, Dale GL.** Coated-platelet levels are low in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2009;40(7):2578-80.

[23] **Daskalakis M, Colucci G, Keller P, Rochat S, Silzle T, Biasiutti FD, Barizzi G, Alberio L.** Decreased generation of procoagulant platelets detected by flow cytometric analysis in patients with bleeding diathesis. *Cytometry B Clin Cytom* 2014;86(6):397-409.

[24] **Prodan CI, Dale GL.** Coated-platelets in ischemic stroke - potential insight into the etiology of stroke subtypes. *Int J Stroke* 2008;3(4):249-50.

[25] **Prodan CI, Vincent AS, Dale GL.** Coated-platelet levels are elevated in patients with transient ischemic attack. *Transl Res* 2011;158(1):71-5.

[26] **Holmes CE, Bouchard BA, Barbick R, Safdar H, Tracy PB.** The existence of platelet subpopulations in patients with myeloproliferative disease: preliminary correlation with clinically abnormal hemostasis. *Blood* 2003;102(11):787a.

[27] **Saxena K, Pethe K, Dale GL.** Coated-platelet levels may explain some variability in clinical phenotypes observed with severe hemophilia. *J Thromb Haemost* 2010;8(5):1140-2.

[28] **Jackson SP, Schoenwaelder SM.** Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011-8.

[29] **Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T.** Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002;88:186-93.

[30] **Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X.** Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2341-49.

[31] **Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J.** Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011;11:264-74.

[32] **Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE Jr, Michel LV, Connors S, Oenick M, D'Amato RJ, Klement GL, Folkman J.** VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis* 2012;15:265-73.

[33] **de Groot PG, Urbanus RT, Roest M.** Platelet interaction with the vessel wall. *Handb Exp Pharmacol* 2012:87-110.

[34] **Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW.** Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood* 2012;120(26):5209-16.

[35] **Vélez P, Parguiña AF, Ocaranza-Sánchez R, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Alonso-Orgaz S, de la Cuesta F, Guitián E, Moreu J, Barderas MG, González-Juanatey JR, García Á.** Identification of a circulating microvesicle protein network involved in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2014;112(4):716-26.

[36] **Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz** M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196(7):887-96.

[37] **Hernández-Ruiz L, Valverde F, Jimenez-Nuñez MD, Ocaña E, Sáez-Benito A, Rodríguez-Martorell J, Bohórquez JC, Serrano A, Ruiz FA.** Organellar proteomics of human platelet dense granules reveals that 14-3-3ζ is a granule protein related to atherosclerosis. *J Proteome Res* 2007;6(11):4449-57.

[38] **King SM, Reed GL.** Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(4):293-302.

[39] **Italiano JE Jr, Battinelli EM.** Selective sorting of alpha-granule proteins. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:173-6.

[40] **Blair P, Flaumenhaft R.** Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23(4):177-89.

[41] **Raposo G, Stoorvogel W.** Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200(4):373-83.

[42] **Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF.** The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res* 2005;4(5):1516-21.

[43] **VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R.** Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003;59(2):277-87.

[44] **Horstman LL, Ahn YS.** Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;30(2):111-42.

[45] **Libby P, Ridker P, Hansson G.** Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(23):2129-38.

[46] **Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A.** Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841-3.

[47] **Biasucci LM, Porto I, Di Vito L, De Maria GL, Leone AM, Tinelli G, Tritarelli A, Di Rocco G, Snider F, Capogrossi MC, Crea F.** Differences in microparticle release in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J* 2012;76(9):2174-82.

[48] **Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS.** High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003;145(6):962-70.

[49] **Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, Kido H, Kagawa H, Fukuhara S.** Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1995;116(2):235-40.

[50] **Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A.** Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95(3):930-5.

[51] **Vélez P, García A.** Platelet proteomics in cardiovascular diseases. *Transl Proteomics* 2015;7:15-29.

[52] **Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987;92(1):181-7.

[53] **Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2(8567):1057-8.

[54] **Loscalzo J.** Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001;88(8):756-62.

[55] **Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR.** The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997;99(6):1351-60.

[56] **Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, Levi R.** Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost* 2005;31(2):234-46.

[57] **Gibbins JM.** Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 2004;117:3415-25.

[58] **Nieswandt B, Watson SP.** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-61.

[59] **Liddington RC, Ginsberg MH.** Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 2002;158(5):833-9.

[60] **Calvete JJ.** Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIbbeta3. *Exp Biol Med* 2004;229:732–44.

[61] **Shattil SJ, Newman PJ.** Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;104:1606-15.

[62] **Offermanns S.** Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99(12):1293-304.

[63] **Danielli JF.** Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol* 1940;98(1):109-29.

[64] **Lo SK, Burhop KE, Kaplan JE, Malik AB.** Role of platelets in maintenance of pulmonary vascular permeability to protein. *Am J Physiol* 1988;254(4 Pt 2):H763-71.

[65] **Aursnes I.** Increased permeability of capillaries to protein during thrombocytopenia. An experimental study in the rabbit. *Microvasc Res* 1974;7(3):283-95.

[66] **Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD.** How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 1:56-65.

[67] **Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O.** Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2(12):2096-102.

[68] **Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S.** Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28(2):451-7.

[69] **Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN.** Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 2000;96(13):4046-54.

[70] **Czapiga M, Gao JL, Kirk A, Lekstrom-Himes J.** Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors. *Exp Hematol* 2005;33(1):73-84.

[71] **Cosgrove LJ, d'Apice AJ, Haddad A, Pedersen J, McKenzie IF.** CR3 receptor on platelets and its role in the prostaglandin metabolic pathway. *Immunol Cell Biol* 1987;65(Pt6):453-60.

[72] **Rosenfeld SI, Looney RJ, Leddy JP, Phipps DC, Abraham GN, Anderson CL.** Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J Clin Invest* 1985;76(6):2317-22.

[73] **Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P.** A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 1983;303(5920):810-2.

[74] **Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslée D, Capron A.** Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* 1986;231(4734):153-6.

[75] **Ockenhouse CF, Magowan C, Chulay JD.** Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor in vitro. *J Clin Invest* 1989;84(2):468-75.

[76] **Joseph, M.** Generation of free radicals by platelets. In: M. Joseph, (Ed.), Immunopharmacology of platelets. London: Academic Press 1995; pp. 209-225.

[77] **Kitagawa S, Fujisawa H, Kametani F, Sakurai H.** Generation of active oxygen species in blood platelets--spin trapping analysis. *Free Radic Res Commun* 1992;15(6):319-24.

[78] **Tew JG, Roberts RR, Donaldson DM.** Release of beta-lysin from platelets by thrombin and by a factor produced in heparinized blood. *Infect Immun* 1974;9(1):179-86.

[79] **Dankert J.** Role of platelets in early pathogenesis of viridans group streptococcal endocarditis: a study on thrombodefensins. PhD Dissertation. The Netherlands: University of Groningen 1988.

[80] **Dankert J, van der Werff J, Zaat SA, Joldersma W, Klein D, Hess J.** Involvement of bactericidal factors from thrombin-stimulated platelets in clearance of adherent viridans streptococci in experimental infective endocarditis. *Infect Immun* 1995;63(2):663-71.

[81] **Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F.** Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology? *Crit Care* 2013;17(4):236.

[82] **Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zéni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F.** Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* 2012;145(3):189-200.

[83] **Bijl M.** Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Neth J Med* 2003;61(9):273-7.

[84] **Steinhubl SR, Moliterno DJ.** The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005;5(6):399-408.

[85] **Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB.** Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004;103(6):2096-104.

[86] **Wagner DD, Burger PC.** Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2131-7.

[87] **Gawaz M, Langer H, May AE.** Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3378-84.

[88] **McNicol A, Israels SJ.** Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008;8(2):99-117.

[89] **Trousseau A.** Phlegmasia alba dolens, Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris, London. *New Syndenham Society* 1865;3:94-6.

[90] **Philippe C, Philippe B, Fouqueray B, Perez J, Lebret M, Baud L.** Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. A*m J Pathol* 1993;143(6):1713-23.

[91] **Shau H, Roth MD, Golub SH.** Regulation of natural killer function by nonlymphoid cells. *Nat Immun* 1993;12(4-5):235-49.

[92] **Homayouni R, Rice DS, Sheldon M, Curran T.** Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1. *J Neurosci* 1999;19(17):7507-15.

[93] **King GD, Scott Turner R.** Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk? *Exp Neurol* 2004;185(2):208-19.

[94] **Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW.** Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 2004;143(7):819-26.

[95] **Warren B.** The microinjury hypothesis, metastasis. In: Honn KV and Sloane BF editors. Hemostatic mechanisms and metastasis. M Nijhoff, Boston 1984; p. 56.

[96] **Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S.** Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(2):663-8.

[97] **Hara Y, Steiner M, Baldini MG.** Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer Res* 1980;40(4):1212-6.

[98] **Kepner N, Lipton A.** A mitogenic factor for transformed fibroblasts from human platelets. *Cancer Res* 1981;41(2):430-2.

[99] **Cowan DH, Graham J.** Effect of platelet growth factor(s) on growth of human tumor colonies. *Prog Clin Biol Res* 1982;89:249-68.

[100] **Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karpatkin S.** Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 2002;99(5):1646-50.

[101] **Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF.** In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998;275(3Pt2):H1054-61.

[102] **Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M.** Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005;166(3):913-21.

[103] **Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y.** Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282(36):25993-6001.

[104] **Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, Segalés E, Llorente V.** Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32(5-6):225-31.

[105] **Badimon L, Vilahur G.** Platelets, arterial thrombosis and cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2007;24 Suppl 1:30-9.

[106] **Weyrich A, Cipollone F, Mezzetti A, Zimmerman G.** Platelets in atherothrombosis: new and evolving roles. *Curr Pharm Design* 2007;13:1685–91.

[107] **Lahoz C, Mostaza JM.** La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol* 2007;60(2):184-95.

[108] **World Health Organization.** Fact Sheet 310: Top ten causes of death. May 2011.

[109] **Banegas JR, Villar F, Graciani A, Rodríguez-Artalejo F.** Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006;6:G3-12.

[110] **Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA.** Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326(5):287-91.

[111] **Lee CW, Hwang I, Park CS, Lee H, Park DW, Kang SJ, Lee SW, Kim YH, Park SW, Park SJ.** Comparison of intravascular ultrasound and histological findings in culprit coronary plaques between ST-segment elevation and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2013;112(1):68-72.

[112] **Sherman CT, Litvack F, Grundfest W, Lee M, Hickey A, Chaux A, Kass R, Blanche C, Matloff J, Morgenstern L, Ganz W, Swan HJC, Forrester J.** Coronary angioscopy in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med* 1986;315(15):913-9.

[113] **Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B, Gibbins JM.** Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* 2008;154(5):918-39.

[114] **Antithrombotic Trialists' Collaboration.** Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324(7329):71-86.

[115] **Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S.** Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J* 2010;74(4):597-607.

[116] **Barnathan ES, Schwartz JS, Taylor L, Laskey WK, Kleaveland JP, Kussmaul WG, Hirshfeld JW Jr.** Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 1987;76(1):125-34.

[117] **Antiplatelet Trialists' Collaboration.** Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy—I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994;308(6921):81-106.

[118] **Michelson AD.** Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(2):154-69.

[119] **Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr, King SB 3rd, Anderson JL, Antman EM, Bailey SR, Bates ER, Blankenship JC, Casey DE Jr, Green LA, Hochman JS,**

Jacobs AK, Krumholz HM, Morrison DA, Ornato JP, Pearle DL, Peterson ED, Sloan MA, Whitlow PL, Williams DO. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(23):2205-41.

[120] **Feher G, Feher A, Pusch G, Koltai K, Tibold A, Gasztonyi B, Papp E, Szapary L, Kesmarky G, Toth K.** Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance. *World J Cardiol* 2010;2(7):171-86.

[121] **Pena A, Collet JP, Hulot JS, Silvain J, Barthélémy O, Beygui F, Funck-Brentano C, Montalescot G.** Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009;119(21):2854-7.

[122] **Lamberts M, Olesen JB, Ruwald MH, Hansen CM, Karasoy D, Kristensen SL, Køber L, Torp-Pedersen C, Gislason GH, Hansen ML.** Bleeding after initiation of multiple antithrombotic drugs, including triple therapy, in atrial fibrillation patients following myocardial infarction and coronary intervention: a nationwide cohort study. *Circulation* 2012;126(10):1185-93.

[123] **Franchi F, Angiolillo DJ.** Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol* 2015;12(1):30-47.

[124] **Furihata K, Clemetson KJ, Deguchi H, Kunicki TJ.** Variation in human platelet glycoprotein VI content modulates glycoprotein VI-specific prothrombinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(11):1857-63.

[125] **Best D, Senis YA, Jarvis GE, Eagleton HJ, Roberts DJ, Saito T, Jung SM, Moroi M, Harrison P, Green FR, Watson SP.** GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* 2003;102(8):2811-8.

[126] **Samaha FF, Hibbard C, Sacks J, Chen H, Varello MA, George T, Kahn ML.** Measurement of platelet collagen receptor density in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(11):e181-2.

[127] **Senis YA, Tomlinson MG, Ellison S, Mazharian A, Lim J, Zhao Y, Kornerup KN, Auger JM, Thomas SG, Dhanjal T, Kalia N, Zhu JW, Weiss A, Watson SP.** The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis. *Blood* 2009;113(20):4942-54.

[128] **Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M, Lüscher EF.** Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in

Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1982;70(2):304-11.

[129] **Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H.** A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1987;69(6):1712-20.

[130] **Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K.** A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 1989;84(5):1440-5.

[131] **Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K**. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol* 1995;89(1):124-30.

[132] **Takahashi H, Moroi M.** Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 2001;67(4):262-7.

[133] **Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H.** Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem* 2000;275(31):23998-4002.

[134] **Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ.** The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 1999;274(41):29019-24.

[135] **Horii K, Kahn ML, Herr AB.** Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood* 2006;108(3):936-42.

[136] **Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP.** Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* 1997;413(2):255-9.

[137] **Dütting S, Bender M, Nieswandt B.** Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(11):583-90.

[138] **Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, Farndale RW, Barnes MJ.** Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res* 1999;41(2):450-7.

[139] **Zhang WM, Kapyla J, Puranen JS, Knight CG, Tiger CF, Pentikainen OT, Johnson MS, Farndale RW, Heino J, Gullberg D.** Alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J Biol Chem* 2003;278(9):7270-7.

[140] **Morton LF, Peachey AR, Barnes MJ.** Platelet-reactive sites in collagens type I and type III. Evidence for separate adhesion and aggregatory sites. *Biochem J* 1989;258(1):157-63.

[141] **Santoro SA, Walsh JJ, Staatz WD, Baranski KJ.** Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul* 1991;2(11):905-13.

[142] **Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY.** GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010;8(7):1456-67.

[143] **Riba R, Patel B, Aburima A, Naseem KM.** Globular adiponectin increases cGMP formation in blood platelets independently of nitric oxide. *J Thromb Haemost* 2008;6(12):2121-31.

[144] **Morton LF, Hargreaves PG, Farndale RW, Young RD, Barnes MJ.** Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J* 1995;306(Pt 2):337-44.

[145] **Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, Barnes MJ, Watson SP.** A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood* 1997;89(4):1235-42.

[146] **Polgár J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ.** Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from Crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem* 1997;272(21):13576-83.

[147] **Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C.** Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* 1997;272(43):27035-41.

[148] **Murakami MT, Zela SP, Gava LM, Michelan-Duarte S, Cintra AC, Arni RK.** Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked alpha4beta4 cyclic tetramer from the venom of Crotalus durissus terrificus. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(2):478-82.

[149] **Batuwangala T, Leduc M, Gibbins JM, Bon C, Jones EY**. Structure of the snake-venom toxin convulxin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60(Pt 1):46-53.

[150] **Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H.** A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997;272(38):23528-31.

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

[152] **Wonerow P, Obergfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, Leo A, Schraven B, Horejsí V, Shattil SJ, Watson SP.** Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cgamma2 regulation in platelets. *Biochem J* 2002;364(Pt 3):755-65.

[153] **Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP.** The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997;16(9):2333-41.

[154] **Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M.** Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem 2002*;277(48):46197-204.

[155] **Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, O'Connor MN, Knight CG, Herr AB, Ouwehand WH, Farndale RW.** Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem* 2007;282(2):1296-304.

[156] **Arthur JF, Shen Y, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK, Gardiner EE.** Ligand binding rapidly induces disulfide-dependent dimerization of glycoprotein VI on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem* 2007;282(42):30434-41.

[157] **Loyau S, Dumont B, Ollivier V, Boulaftali Y, Feldman L, Ajzenberg N, Jandrot-Perrus M.** Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(3):778-85.

[158] **Dütting S, Nieswandt B.** Better safe than sorry: glycoprotein VI dimerization as a novel checkpoint and early biomarker of platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(3):552-3.

[159] **Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK, Berndt MC.** Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost* 2007;5(7):1530-7.

[160] **Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Couedic JP, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W, Villeval JL.** Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000;96(5):1798-807.

[161] **Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B.** A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003;197(1):41-9.

[162] **Nieswandt B, Pleines I, Bender M.** Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 1:92-104.

[163] **Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, Brandl R, Seidl S, Massberg S, Pichler B, Kremmer E, Stellos K, Schönberger T, Siess W, Gawaz M.** Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogression in vivo. *Basic Res Cardiol* 2008;103:356-67.

[164] **Bültmann A, Li Z, Wagner S, Peluso M, Schönberger T, Weis C, Konrad I, Stellos K, Massberg S, Nieswandt B, Gawaz M, Ungerer M, Münch G.** Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:532-42.

[165] **Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H.** Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 2001;193:459-69.

[166] **Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, Nergiz-Unal R, Prinzen L, Heeneman S, Lutgens E, van Zandvoort MA, Nieswandt B, Egbrink MG, Heemskerk JW.** Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost* 2009;7:152-61.

[167] **Hechler B, Gachet C.** Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost* 2011;105 Suppl 1:S3-12.

[168] **Zahid M, Mangin P, Loyau S, Hechler B, Billiald P, Gachet C, Jandrot-Perrus M.** The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost* 2012;10:2418-27.

[169] **Bigalke B, Lindemann S, Ehlers R, Seizer P, Daub K, Langer H, Schonberger T, Kremmer E, Siegel-Axel D, May AE, Gawaz M.** Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2006;27(18):2165-9.

[170] **Bigalke B, Geisler T, Stellos K, Langer H, Daub K, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S, Gawaz M.** Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2008;156(1):193-200.

[171] **Bigalke B, Stellos K, Stakos D, Joos T, Pötz O, Geisler T, Bischofs C, Kremmer E, Krämer BF, Seizer P, May AE, Lindemann S, Gawaz M.** Influence of platelet count on the expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2009;101(5):911-5.

[172] **Bigalke B, Stellos K, Geisler T, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S, Gawaz M.** Glycoprotein VI for diagnosis of acute coronary syndrome when ECG is ambiguous. *Int J Cardiol* 2011;149(2):164-8.

[173] **Bigalke B, Pötz O, Kremmer E, Geisler T, Seizer P, Puntmann VO, Phinikaridou A, Chiribiri A, Nagel E, Botnar RM, Joos T, Gawaz M.** Sandwich immunoassay for soluble glycoprotein VI in patients with symptomatic coronary artery disease. *Clin Chem* 2011;57(6):898-904.

[174] **Bigalke B, Elvers M, Schönberger T, Gawaz M.** Platelet and soluble glycoprotein VI - novel applications in diagnosis and therapy. *Curr Drug Targets* 2011;12(12):1821-30.

[175] **Parguiña AF, Grigorian-Shamagian L, Agra RM, López-Otero D, Rosa I, Alonso J, Teijeira-Fernández E, González-Juanatey JR, García Á.** Variations in platelet proteins associated with ST-elevation myocardial infarction: novel clues on pathways underlying platelet activation in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(12):2957-64.

[176] **Matsumoto Y, Takizawa H, Gong X, Le S, Lockyer S, Okuyama K, Tanaka M, Yoshitake M, Tandon NN, Kambayashi J.** Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thromb Res* 2007;119(3):319-29.

[177] **Matsumoto Y, Takizawa H, Nakama K, Gong X, Yamada Y, Tandon NN, Kambayashi J**. Ex vivo evaluation of anti-GPVI antibody in cynomolgus monkeys:

dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb Haemost* 2006;96(2):167-75.

[178] **Li H, Lockyer S, Concepcion A, Gong X, Takizawa H, Guertin M, Matsumoto Y, Kambayashi J, Tandon NN, Liu Y.** The Fab fragment of a novel anti-GPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(5):1199-205.

[179] **Ohlmann P, Hechler B, Ravanat C, Loyau S, Herrenschmidt N, Wanert F, Jandrot-Perrus M, Gachet C.** Ex vivo inhibition of thrombus formation by an anti-glycoprotein VI Fab fragment in non-human primates without modification of glycoprotein VI expression. *J Thromb Haemost* 2008;6(6):1003-11.

[180] **Rusconi CP, Layzer JM, Stell BG, Mahanty SK, Quick RJ, Wyrzykiewicz TK, Brooks GG, Zelenkofske S.** Discovery of a novel aptamer-based inhibitor of GPVI and itsmatched active control agent. *Circulation* 2010;122:A10987(Abstract).

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

[182] **Schönberger T, Ziegler M, Borst O, Konrad I, Nieswandt B, Massberg S, Ochmann C, Jürgens T, Seizer P, Langer H, Münch G, Ungerer M, Preissner KT, Elvers M, Gawaz M.** The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;303(7):C757-66.

[183] **Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, Goebel S, Vogelmann J, Holthoff HP, Gawaz M, Münch G**. The GPVI-Fc fusion protein Revacept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PLoS One* 2013;8(8):e71193.

[184] **Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Münch G.** Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation* 2011;123(17):1891-9.

[185] **Rabie T, Varga-Szabo D, Bender M, Pozgaj R, Lanza F, Saito T, Watson SP, Nieswandt B.** Diverging signaling events control the pathway of GPVI down-regulation in vivo. *Blood* 2007;110(2):529-35.

[186] **Reilly MP, Sinha U, André P, Taylor SM, Pak Y, Deguzman FR, Nanda N, Pandey A, Stolla M, Bergmeier W, McKenzie SE.** PRT-060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. *Blood* 2011;117(7):2241-6.

[187] **Witzig TE, Gupta M.** Signal transduction inhibitor therapy for lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:265-70.

[188] **Grothusen C, Umbreen S, Konrad I, Stellos K, Schulz C, Schmidt B, Kremmer E, Teebken O, Massberg S, Luchtefeld M, Schieffer B, Gawaz M.** EXP3179 inhibits collagen-dependent platelet activation via glycoprotein receptor-VI independent of AT1-receptor antagonism: potential impact on atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(5):1184-90.

[189] **Ono K, Ueda H, Yoshizawa Y, Akazawa D, Tanimura R, Shimada I, Takahashi H.** Structural basis for platelet antiaggregation by angiotensin II type 1 receptor antagonist losartan (DuP-753) via glycoprotein VI. *J Med Chem* 2010;53(5):2087-93.

[190] **Jiang P, Loyau S, Tchitchinadze M, Ropers J, Jondeau G, Jandrot-Perrus M.** Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan. *PLoS One* 2015;10(6):e0128744.

[191] **Bishton MJ, Gardiner EE, Harrison SJ, Prince HM, Johnstone RW.** Histone deacetylase inhibitors reduce glycoprotein VI expression and platelet responses to collagen related peptide. *Thromb Res* 2013;131(6):514-20.

[192] **Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RD, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VL, Ozaki Y, Watson SP.** A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 2006;107(2):542-9.

[193] **Bigalke B, Krämer BF, Seizer P, Fateh-Moghadam S, Gawaz M, Lindemann S.** Diagnostic and therapeutic potentials of platelet glycoprotein VI. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(2):203-11.

[194] **Mangin PH, Tang C, Bourdon C, Loyau S, Freund M, Hechler B, Gachet C, Jandrot-Perrus M.** A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341(1):156-63.

[195] **Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I.** Progress with gene-

product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-4.

[196] **Rabilloud T.** Variations on a theme: changes to electrophoretic separations that can make a difference. *J Proteomics* 2010;73(8):1562-72.

[197] **Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 2010;73(11):2064-77.

[198] **Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabuddhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LD, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TS, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A**. A draft map of the human proteome. *Nature* 2014;509(7502):575-81.

[199] **Sanchez C, Lachaize C, Janody F, Bellon B, Röder L, Euzenat J, Rechenmann F, Jacq B.** Grasping at molecular interactions and genetic networks in Drosophila melanogaster using FlyNets, an Internet database. *Nucleic Acids Res* 1999;27(1):89-94.

[200] **Kitano H.** Systems biology: a brief overview. *Science* 2002;295(5560):1662-4.

[201] **Cazzulo JJ.** De la genómica a la proteómica. In: Corrales F and Calvete JJ editors. Manual de proteómica. Sociedad Española de Proteómica. 2014; p.19.

[202] **Sacristán D, Marques M, Zamorano-León JJ, Luque M, Armengol J, Del Castillo J, Martín J, Delpón E, Ramos-Mozo P, de Prada TP, Tamargo J, Barrientos A, Macaya C, López-Farré A.** Modifications by Olmesartan medoxomil treatment of the platelet protein profile of moderate hypertensive patients. *Proteomics Clin Appl* 2008;2(9):1300-12.

[203] **Coppinger JA, O'Connor R, Wynne K, Flanagan M, Sullivan M, Maguire PB, Fitzgerald DJ, Cagney G**. Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood* 2007;109(11):4786-92.

[204] **Aldemir H, Kiliç N**. The effect of time of day and exercise on platelet functions and platelet-neutrophil aggregates in healthy male subjects. *Mol Cell Biochem* 2005;280(1-2):119-24.

[205] **Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A.** Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 2006;38(2):174-87.

[206] **Zellner M, Oehler R.** Sample preparation variables in platelet proteomics for biomarker research. In: García Á, Senis YA, editors. Platelet Proteomics. Principles, Analysis, and Applications, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2011; pp. 67-86.

[207] **O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF.** Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* 2002;2:288-305.

[208] **Thiele T, Steil L, Gebhard S, Scharf C, Hammer E, Brigulla M, Lubenow N, Clemetson KJ, Völker U, Greinacher A.** Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 2007;47:1221-33.

[209] **Springer DL, Miller JH, Spinelli SL, Pasa-Tolic L, Purvine SO, Daly DS, Zangar RC, Jin S, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, Casey AE, Wittlin SD, Phipps RP.** Platelet proteome changes associated with diabetes and during platelet storage for transfusion. *J Proteome Res* 2009;8:2261-72.

[210] **Yamodo IH, Blystone SD.** Calcium Integrin Binding Protein Associates with Integrins αVβ3 and αIIbβ3 Independent of β3 Activation Motifs. *Cellbio (Irvine, Calif)* 2012;1(2):30-7.

[211] **García A.** Two-dimensional gel electrophoresis in platelet proteomics research. *Methods Mol Med* 2007;139:339-53.

[212] **Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, von Andrian UH, Wagner DD, Stossel TP, Hartwig JH.** The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell* 2003;112(1):87-97.

[213] **Arentz G, Weiland F, Oehler MK, Hoffmann P.** State of the art of 2D DIGE. *Proteomics Clin Appl* 2015;9(3-4):277-88.

[214] **Timms JF, Cramer R.** Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 2008;8(23-24):4886-97.

[215] **Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I.** A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003;3:36-44.

[216] **Marouga R, David S, Hawkins E.** The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:669-78.

[217] **Andrecht S, von Hagen J.** General Aspects of Sample Preparation for Comprehensive Proteome Analysis. *In: von Hage J, editor. Proteomics Sample Preparation, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* 2008; pp. 5-20.

[218] **Görg A, Weiss W, Dunn MJ.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004;4:3665-85.

[219] **Dowsey AW, Dunn MJ, Yang G-Z.** The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3:1567-96.

[220] **Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J.** The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biot* 2007;76:1223-43.

[221] **Wu CC, MacCoss MJ.** Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4(3):242-50.

[222] **Gelpi E**. From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part I, 1965-1984. *J Mass Spectrom* 2008; 43:419-35.

[223] **Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB.** Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 1985;57:675-9.

[224] **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.

[225] **Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60(20):2299-301.

[226] **Aebersold R, Mann M.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422(6928):198-207.

[227] **Kapp E, Schütz F.** Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. *Curr Protoc Protein Sci* 2007;49:25.2.1-25.2.19.

[228] **Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD.** Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 2004;103:3624-34.

[229] **Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C.** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *P Natl Acad Sci Usa* 1993;90:5011-5.

[230] **Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ.** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993;3:327-32.

[231] **James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G.** Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Bioph Res Co* 1993;195:58-64.

[232] **Mann M, Højrup P, Roepstorff P.** Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological Mass Spectrometry* 1993;22:338-45.

[233] **Yates JR, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T.** Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* 1993;214:397-408.

[234] **Mann M, Hendrickson RC, Pandey A.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem 2001*;70:437-73.

[235] **Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3551-67.

[236] **Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS.** Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 2011;118(14):e101-11.

[237] **Eicher JD, Wakabayashi Y, Vitseva O, Esa N, Yang Y, Zhu J, Freedman JE, McManus DD, Johnson AD.** Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets* 2016;27(3):230-9.

[238] **Londin ER, Hatzimichael E, Loher P, Edelstein L, Shaw C, Delgrosso K, Fortina P, Bray PF, McKenzie SE, Rigoutsos I.** The human platelet: strong transcriptome correlations among individuals associate weakly with the platelet proteome. *Biol Direct* 2014;9:3.

[239] **Burkhart JM, Gambaryan S, Watson SP, Jurk K, Walter U, Sickmann A, Heemskerk JW, Zahedi RP.** What can proteomics tell us about platelets? *Circ Res* 2014;114(7):1204-19.

[240] **Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF.** The platelet proteome. *Curr Opin Hematol* 2009;16(5):329-33.

[241] **Dittrich M, Birschmann I, Mietner S, Sickmann A, Walter U, Dandekar T.** Platelet protein interactions: map, signaling components, and phosphorylation groundstate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(7):1326-31.

[242] **Handagama PJ, George JN, Shuman MA, McEver RP, Bainton DF.** Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(3):861-5.

[243] **Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND, Kraiss LW, Dixon DA, Mahoney TM, Prescott SP, McIntyre TM, Zimmerman GA.** Change in protein phenotype

without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(4):491-8.

[244] **Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA.** Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost* 2009;7(2):241-6.

[245] **Gravel P, Sanchez JC, Walzer C, Golaz O, Hochstrasser DF, Balant LP, Hughes GJ, Garcia-Sevilla J, Guimon J.** Human blood platelet protein map established by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1995;16(7):1152-9.

[246] **Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer HE.** Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* 2000;21:2622-36.

[247] **Marcus K, Moebius J, Meyer HE.** Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. *Anal Bioanal Chem* 2003;376(7):973-93.

[248] **García A, Prabhakar S, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF, Zitzmann N.** Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:656-68.

[249] **García A, Prabhakar S, Hughan S, Anderson TW, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF, Zitzmann N.** Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood* 2004;103:2088–95.

[250] **Senis YA, Antrobus R, Severin S, Parguiña AF, Rosa I, Zitzmann N, Watson SP, García A.** Proteomic analysis of integrin alphaIIbbeta3 outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions. *J Thromb Haemost* 2009;7(10):1718-26.

[251] **Parguiña AF, Alonso J, Rosa I, Vélez P, González-López MJ, Guitián E, Eble JA, Loza MI, García Á.** A detailed proteomic analysis of rhodocytin-activated platelets reveals novel clues on the CLEC-2 signalosome: implications for CLEC-2 signaling regulation. *Blood* 2012;120(26):e117-26.

[252] **Martens L, Van Damme P, Van Damme J, Staes A, Timmerman E, Ghesquière B, Thomas GR, Vandekerckhove J, Gevaert K.** The human platelet proteome mapped by peptide-centric proteomics: a functional protein profile. *Proteomics* 2005;5(12):3193-204.

[253] **Májek P, Reicheltová Z, Stikarová J, Suttnar J, Sobotková A, Dyr JE.** Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. *Proteome Sci* 2010;8:56.

[254] **Thon JN, Schubert P, Duguay M, Serrano K, Lin S, Kast J, Devine DV.** Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches. *Transfusion* 2008;48(3):425-35.

[255] **Prudent M, D'Alessandro A, Cazenave JP, Devine DV, Gachet C, Greinacher A, Lion N, Schubert P, Steil L, Thiele T, Tissot JD, Völker U, Zolla L.** Proteome changes in platelets after pathogen inactivation--an interlaboratory consensus. *Transfus Med Rev* 2014;28(2):72-83.

[256] **Jensen ON.** Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(1):33-41.

[257] **Zahedi RP, Lewandrowski U, Wiesner J, Wortelkamp S, Moebius J, Schütz C, Walter U, Gambaryan S, Sickmann A.** Phosphoproteome of resting human platelets. *J Proteome Res* 2008;7(2):526-34.

[258] **Qureshi AH, Chaoji V, Maiguel D, Faridi MH, Barth CJ, Salem SM, Singhal M, Stoub D, Krastins B, Ogihara M, Zaki MJ, Gupta V.** Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. *PLoS One* 2009;4(10):e7627.

[259] **Gevaert K, Eggermont L, Demol H, Vandekerckhove J.** A fast and convenient MALDI-MS based proteomic approach: identification of components scaffolded by the actin cytoskeleton of activated human thrombocytes. *J Biotechnol* 2000;78(3):259-69.

[260] **Senis YA, Tomlinson MG, García A, Dumon S, Heath VL, Herbert J, Cobbold SP, Spalton JC, Ayman S, Antrobus R, Zitzmann N, Bicknell R, Frampton J, Authi KS, Martin A, Wakelam MJ, Watson SP.** A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein. *Mol Cell Proteomics* 2007;6(3):548-64.

[261] **Zahedi RP, Begonja AJ, Gambaryan S, Sickmann A.** Phosphoproteomics of human platelets: A quest for novel activation pathways. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764(12):1963-76.

[262] **Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N.** On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473(1):4-8.

[263] **Wang Y, Jobe SM, Ding X, Choo H, Archer DR, Mi R, Ju T, Cummings RD.** Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(40):16143-8.

[264] **Gu J, Taniguchi N.** Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* 2004;21(1-2):9-15.

[265] **Kunicki TJ, Cheli Y, Moroi M, Furihata K.** The influence of N-linked glycosylation on the function of platelet glycoprotein VI. *Blood* 2005;106(8):2744-9.

[266] **Van Geet C, Jaeken J, Freson K, Lenaerts T, Arnout J, Vermylen J, Hoylaerts MF.** Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J Inherit Metab Dis* 2001;24(4):477-92.

[267] **Burkhart JM, Sickmann A.** Mass-Spectrometry-Based Proteomics: General Overview and Posttranslational Modification Analysis in the Context of Platelet Research. In: García Á, Senis YA, editors. Platelet Proteomics. Principles, Analysis, and Applications, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2011; pp. 27-65.

[268] **Resh MD.** Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE* 2006;2006(359):14.

[269] **Linder ME, Deschenes RJ.** Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):74-84.

[270] **Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH.** The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* 2010;191(7):1229-38.

[271] **Dowal L, Yang W, Freeman MR, Steen H, Flaumenhaft R.** Proteomic analysis of palmitoylated platelet proteins. *Blood* 2011;118(13):e62-73.

[272] **Almén MS, Nordström KJ, Fredriksson R, Schiöth HB.** Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol* 2009;7:50.

[273] **Hopkins AL, Groom CR.** The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(9):727-30.

[274] **Moebius J, Zahedi RP, Lewandrowski U, Berger C, Walter U, Sickmann A.** The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1754-61.

[275] **Lewandrowski U, Wortelkamp S, Lohrig K, Zahedi RP, Wolters DA, Walter U, Sickmann A.** Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research. *Blood* 2009;114(1):e10-9.

[276] **Kaiser WJ, Holbrook LM, Tucker KL, Stanley RG, Gibbins JM.** A functional proteomic method for the enrichment of peripheral membrane proteins reveals the collagen binding protein Hsp47 is exposed on the surface of activated human platelets. *J Proteome Res* 2009;8(6):2903-14.

[277] **Tucker KL, Kaiser WJ, Bergeron AL, Hu H, Dong JF, Tan TH, Gibbins JM.** Proteomic analysis of resting and thrombin-stimulated platelets reveals the translocation and functional relevance of HIP-55 in platelets. *Proteomics* 2009;9(18):4340-54.

[278] **Greening DW, Glenister KM, Kapp EA, Moritz RL, Sparrow RL, Lynch GW, Simpson RJ.** Comparison of human platelet membrane-cytoskeletal proteins with the plasma proteome: Towards understanding the platelet-plasma nexus. *Proteomics Clin Appl* 2008;2(1):63-77.

[279] **Piersma SR, Broxterman HJ, Kapci M, de Haas RR, Hoekman K, Verheul HM, Jiménez CR.** Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate. *J Proteomics* 2009;72(1):91-109.

[280] **Vélez P, Izquierdo I, Rosa I, García Á.** A 2D-DIGE-based proteomic analysis reveals differences in the platelet releasate composition when comparing thrombin and collagen stimulations. *Sci Rep* 2015;5:8198.

[281] **Shai E, Rosa I, Parguiña AF, Motahedeh S, Varon D, García Á.** Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. *J Proteomics* 2012;76 Spec No.:287-96.

[282] **Milioli M, Ibáñez-Vea M, Sidoli S, Palmisano G, Careri M, Larsen MR.** Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists. *J Proteomics* 2015;121:56-66.

[283] **Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Laganà A**. Proteomic characterization of human platelet-derived microparticles. *Anal Chim Acta* 2013;776:57-63.

[284] **Smalley DM.** The platelet microparticle proteome. In: García Á, Senis YA, editors. Platelet Proteomics. Principles, Analysis, and Applications, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2011; pp. 159-184.

[285] **Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA.** Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007;5:1945-55.

[286] **Maynard DM, Heijnen HFG, Gahl WA, Gunay-Aygun M.** The α-granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. *J Thromb Haemost* 2010;8:1786-96.

[287] **Santoni V, Molloy M, Rabilloud T.** Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 2000;21:1054-70.

[288] **Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M.** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:1033-45.

[289] **Stasyk T, Huber LA.** Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 2004;4:3704-16.

[290] **Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E.** Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* 2005;26:297-319.

[291] **Parguiña AF, Rosa I, García A.** Proteomics applied to the study of platelet-related diseases: aiding the discovery of novel platelet biomarkers and drug targets. *J Proteomics* 2012;76 Spec No.:275-86.

[292] **Walkowiak B, Kaminska M, Okrój W, Tanski W, Sobol A, Zbróg Z, Przybyszewska-Doros I.** The blood platelet proteome is changed in UREMIC patients. *Platelets* 2007;18:386-8.

[293] **Marques M, Sacristán D, Mateos-Cáceres PJ, Herrero J, Arribas MJ, González-Armengol JJ, Villegas A, Macaya C, Barrientos A, López-Farré AJ.** Different protein expression in normal and dysfunctional platelets from uremic patients. *J Nephrol* 2010;23:90-101.

[294] **Pieroni L, Finamore F, Ronci M, Mattoscio D, Marzano V, Mortera SL, Quattrucci S, Federici G, Romano M, Urbani A.** Proteomics investigation of human platelets in healthy donors and cystic fibrosis patients by shotgun nUPLC-MSE and 2DE: a comparative study. *Mol Biosyst* 2011;7:630-9.

[295] **Zellner M, Baureder M, Rappold E, Bugert P, Kotzailias N, Babeluk R, Baumgartner R, Attems J, Gerner C, Jellinger K, Roth E, Oehler R, Umlauf E.** Comparative platelet proteome analysis reveals an increase of monoamine oxidase-B protein expression in Alzheimer's disease but not in non-demented Parkinson's disease patients. *J Proteomics* 2012;75:2080-92.

[296] **Maurer-Spurej E, Kahr WH, Carter CJ, Pittendreigh C, Cameron M, Cyr TD.** The value of proteomics for the diagnosis of a platelet-related bleeding disorder. *Platelets* 2008;19:342-51.

[297] **Di Michele M, Thys C, Waelkens E, Overbergh L, D'Hertog W, Mathieu C, De Vos R, Peerlinck K, Van Geet C, Freson K.** An integrated proteomics and genomics analysis to unravel a heterogeneous platelet secretion defect. *J Proteomics* 2011;74:902-13.

[298] **Thon JN, Schubert P, Devine DV.** Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* 2008;22:268-79.

[299] **Schubert S, Weyrich AS, Rowley JW.** A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood* 2014;124(4):493-502.

[300] **Parguiña AF, Grigorian-Shamajian L, Agra RM, Teijeira-Fernández E, Rosa I, Alonso J, Viñuela-Roldán JE, Seoane A, González-Juanatey JR, García A.** Proteins involved in platelet signaling are differentially regulated in acute coronary syndrome: a proteomic study. *PLoS One* 2010;5(10):e13404.

[301] **Banfi C, Brioschi M, Marenzi G, De Metrio M, Camera M, Mussoni L, Tremoli E.** Proteome of platelets in patients with coronary artery disease. *Exp Hematol* 2010;38(5):341-50.

[302] **López-Farré AJ, Zamorano-Leon JJ, Azcona L, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, González-Armengol J, Villarroel P, Moreno-Herrero R, Rodríguez-Sierra P, Segura A, Tamargo J, Macaya C.** Proteomic changes related to "bewildered" circulating platelets in the acute coronary syndrome. *Proteomics* 2011;11(16):3335-48.

[303] **Volpi E, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giannaccini G, Berti S, Clerico A, Lucacchini A.** Platelet proteome and clopidogrel response in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *Clin Biochem* 2012;45(10-11):758-65.

[304] **Arias-Salgado EG, Larrucea S, Butta N, Fernández D, García-Muñoz S, Parrilla R, Ayuso MS.** Variations in platelet protein associated with arterial thrombosis. *Thromb Res* 2008;122:640-7.

[305] **Gebhard S, Steil L, Peters B, Gesell-Salazar M, Hammer E, Kuttler B, Clemetson KJ, Scharf C, Peters J, Völker U, Rettig R, Greinacher A.** Angiotensin II-dependent hypertension causes reversible changes in the platelet proteome. *J Hypertens* 2011;29(11):2126-37.

[306] **Randriamboavonjy V, Isaak J, Elgheznawy A, Pistrosch F, Frömel T, Yin X, Badenhoop K, Heide H, Mayr M, Fleming I.** Calpain inhibition stabilizes the platelet proteome and reactivity in diabetes. *Blood* 2012;120(2):415-23.

[307] **Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas ME, Darde V, Padial LR, Vivanco F.** Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective. *Expert Rev Proteomics* 2008;5(5):679-91.

[308] **Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP.** The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 2012;120(15):e73-82.

[309] **Maksimenko AV, Golubykh VL, Tischenko EG.** The combination of modified antioxidant enzymes for anti-thrombotic protection of the vascular wall: the significance of covalent connection of superoxide dismutase and catalase activities. *J Pharm Pharmacol* 2004;56(11):1463-8.

[310] **Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Azcona L, Modrego J, Mahillo E, Bernardo E, Fernandez-Ortiz A, López-Farré AJ.** Different expression of proteins in platelets from aspirin-resistant and aspirin-sensitive patients. *Thromb Haemost* 2010;103(1):160-70.

[311] **Azcona L, López Farré AJ, Jiménez Mateos-Cáceres P, Segura A, Rodríguez P, Modrego J, Zamorano-León JJ, Macaya C.** Impact of clopidogrel and aspirin treatment on the expression of proteins in platelets from type-2 diabetic patients with stable coronary ischemia. *J Pharm Sci* 2012;101(8):2821-32.

[312] **Peacock WF.** Will SCUBE1 solve the ischemia marker deficit? *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2181-3.

[313] **Current-Oasis 7 Investigators, Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, Diaz R, Eikelboom JW, Fox KA, Granger CB, Jolly S, Joyner CD, Rupprecht HJ, Widimsky P, Afzal R, Pogue J, Yusuf S.** Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2010; 363:930-42.

[314] **Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, Meisel S, Dalby AJ, Verheugt FW, Goodman SG, Corbalan R, Purdy DA, Murphy SA, McCabe CH, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators.** Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38. *Circulation* 2008;118(16):1626-36.

[315] **Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E, Murphy SA, Gibson CM, McCabe CH, Antman EM; TRITON-TIMI 38 investigators.** Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2009;373(9665):723-31.

[316] **Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA; PLATO Investigators, Freij A, Thorsén M.** Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361(11):1045-57.

[317] **Ramacciotti E, Hawley AE, Wrobleski SK, Myers DD Jr, Strahler JR, Andrews PC, Guire KE, Henke PK, Wakefield TW.** Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis. *Thromb Res* 2010;125(6):e269-74.

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

[319] **Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-8.

[320] **Piccin A, Murphy WG, Smith OP.** Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21(3):157-71.

[321] **Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L.** Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost* 2013;110(2):366-77.

[322] **Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L.** Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 2012;108(6):1208-19.

[323] **Bísaro de Lorenc L, Ramos AM, Sánchez MC, Montenegro R, Chiabrando GA.** Structural evaluation of plasma alpha2-macroglobulin in acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(11):1183-9.

[324] **Mosesson MW.** Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost* 2003;1(2):231-8.

[325] **Abdullah NM, Kachman M, Walker A, Hawley AE, Wrobleski SK, Myers DD, Strahler JR, Andrews PC, Michailidis GC, Ramacciotti E, Henke PK, Wakefield TW.** Microparticle surface protein are associated with experimental venous thrombosis: a preliminary study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15(2):201-8.

[326] **Olofsson PS, Jatta K, Wågsäter D, Gredmark S, Hedin U, Paulsson-Berne G, Söderberg-Nauclér C, Hansson GK, Sirsjö A.** The antiviral cytomegalovirus inducible gene 5/viperin is expressed in atherosclerosis and regulated by proinflammatory agents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):e113-6.

[327] **Distelmaier K, Adlbrecht C, Jakowitsch J, Wagner O, Gerner C, Lang IM, Kubicek M**. Proteomic profiling of acute coronary thrombosis reveals a local decrease in pigment epithelium-derived factor in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2012;123(2):111-9.

[328] **Distelmaier K, Adlbrecht C, Jakowitsch J, Winkler S, Dunkler D, Gerner C, Wagner O, Lang IM, Kubicek M.** Local complement activation triggers neutrophil recruitment to the site of thrombus formation in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2009;102(3):564-72.

[329] **Simon LM, Edelstein LC, Nagalla S, Woodley AB, Chen ES, Kong X, Ma L, Fortina P, Kunapuli S, Holinstat M, McKenzie SE, Dong JF, Shaw CA, Bray PF.** Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood* 2014;123(16):e37-45.

[330] **Togni M, Swanson KD, Reimann S, Kliche S, Pearce AC, Simeoni L, Reinhold D, Wienands J, Neel BG, Schraven B, Gerber A.** Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. *Mol Cell Biol* 2005;25(18):8052-63.

[331] **Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS.** Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001;154(3):485-90.

[332] **Ramaiola I, Padró T, Peña E, Juan-Babot O, Cubedo J, Martin-Yuste V, Sabate M, Badimon L.** Changes in thrombus composition and profilin-1 release in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2015;36(16):965-75.

[333] **Rabhi-Sabile S, Pidard D, Lawler J, Renesto P, Chignard M, Legrand C.** Proteolysis of thrombospondin during cathepsin-G-induced platelet aggregation: functional role of the 165-kDa carboxy-terminal fragment. *FEBS Lett* 1996;386(1):82-6.

[334] **Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG.** The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(3):504-11.

[335] **Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID.** Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007;128(1):171-82.

[336] **Hayashi M, Suzuki H, Kawashima S, Saido TC, Inomata M.** The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 1999;371(2):133-41.

[337] **Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA.** Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 2012;34(1):5-30.

[338] **Suzuki H, Murasaki K, Kodama K, Takayama H.** Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *Br J Haematol* 2003;121(6):904-12.

[339] **Gresele P, Falcinelli E, Loffredo F, Cimmino G, Corazzi T, Forte L, Guglielmini G, Momi S, Golino P.** Platelets release matrix metalloproteinase-2 in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes: possible role in sustained platelet activation. *Eur Heart J* 2011;32(3):316-25.

[340] **Vélez P, Ocaranza-Sánchez R, López-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Bravo S, González-Juanatey JR, García Á.** 2D-DIGE-based proteomic analysis of intracoronary versus peripheral arterial blood platelets from acute myocardial infarction patients: upregulation of platelet activation biomarkers at the culprit site. *Proteomics Clin Appl* 2016. [Epub ahead of print]

[341] **Desch S, Siegemund A, Scholz U, Adam N, Eitel I, de Waha S, Fürnau G, Lurz P, Wetzel S, Schuler G, Thiele H.** Platelet inhibition and GP IIb/IIIa receptor occupancy by intracoronary versus intravenous bolus administration of abciximab in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 2012;101(2):117-24.

[342] **Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators.** Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357(20):2001-15.

[343] **Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C.** Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005;54:2430-35.

[344] **Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, Yuan H, Charlton RK, Bernardo E, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA, Costa MA.** Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary

artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation* 2007;115:708-16.

[345] **Steg PG, James S, Harrington RA, Ardissino D, Becker RC, Cannon CP, Emanuelsson H, Finkelstein A, Husted S, Katus H, Kilhamn J, Olofsson S, Storey RF, Weaver WD, Wallentin L; PLATO Study Group.** Ticagrelor versus clopidogrel in patients with ST-elevation acute coronary syndromes intended for reperfusion with primary percutaneous coronary intervention: A Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial subgroup analysis. *Circulation* 2010;122:2131-41.

[346] **James S, Angiolillo DJ, Cornel JH, Erlinge D, Husted S, Kontny F, Maya J, Nicolau JC, Spinar J, Storey RF, Stevens SR, Wallentin L; PLATO Study Group.** Ticagrelor vs. clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and diabetes: a substudy from the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Eur Heart J* 2010;31:3006-16.

[347] **Lim GB.** Antiplatelet therapy. Intracoronary abciximab during PCI for STEMI. *Nat Rev Cardiol* 2012;9(5):258.

[348] **American College of Emergency Physicians; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE Jr, Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW.** 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(4):e78-140.

[349] **Cosemans JM, Kuijpers MJ, Lecut C, Loubele ST, Heeneman S, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JW.** Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2005;181(1):19-27.

[350] **Reininger AJ Bernlochner I, Penz SM, Ravanat C, Smethurst P, Farndale RW, Gachet C, Brandl R, Siess W.** A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(11):1147-58.

[351] **Bigalke B, Phinikaridou A, Andia ME, Cooper MS, Schuster A, Schönberger T, Griessinger CM, Wurster T, Onthank D, Ungerer M, Gawaz M, Nagel E, Botnar RM.** Positron emission tomography/computed tomographic and magnetic resonance imaging in a murine model of progressive atherosclerosis using (64)Cu-labeled glycoprotein VI-Fc. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013;6(6):957-64.

[352] **Hofer AM.** Interactions between calcium and cAMP signaling. *Curr Med Chem* 2012;19(34):5768-73.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. Anexos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo I. Composición de tampones y soluciones empleadas

ACD o ácido citrato dextrosa:
Ácido cítrico - 78mM
Citrato tri-sódico - 96,6mM
Glucosa - 111 mM

MTB o tampón de Tyrode modificado:
Cloruro sódico - 134 mM
Fosfato disódico - 0,34 mM
Cloruro potásico - 2,9 mM
Bicarbonato sódico - 12 mM
HEPES - 20 mM
Cloruro de magnesio - 1 mM
pH 7,3

Tampón de lisis 2X:
Cloruro sódico - 0,3 M
Tris BASE - 20 mM
EGTA - 2 mM
EDTA - 2 mM
NP-40 - 2% (v/v)
pH 7,5

Tampón de lisis 2X suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas:
Cloruro sódico - 0,3 M
Tris BASE - 20 mM
EGTA - 2 mM
EDTA - 2 mM
NP-40 - 2% (v/v)
Aprotinina - 10 µg/mL
Pepstatina - 1 µg/mL
Leupeptina - 10 µg/mL
AEBSF - 400 µg/mL
Ortovanadato sódico - 5 mM
pH 7,5

Tampón Laemmli 5X:
Tris pH 6,8 - 0,125 M
SDS - 10% (p/v)
Glicerol - 50% (p/v)
β-mercaptoetanol - 25% (v/v)
Trazas de azul de bromofenol

Tampón 2D-DIGE:
Urea - 5 M
Tiourea - 2 M
CHAPS - 65 mM
NDSB-256 - 150 mM
Inhibidores de fosfatasas:
- Ortovanadato de sodio - 1 mM
- Fluoruro de sodio - 0,1 mM
- Benzamidina - 1 mM

Tampón de muestra 2X:
Urea - 5 M
Tiourea - 2 M
CHAPS - 65 mM
NDSB-256 - 150 mM
Tributilfosfina - 4 mM
DTT - 130 mM
Inhibidores de fosfatasas:
- Ortovanadato de sodio - 1 mM
- Fluoruro de sodio - 0,1 mM
- Benzamidina - 1 mM

Trazas de azul de bromofenol

Tampón 2-DE:
Urea - 5 M
Tiourea - 2 M
Tributilfosfina - 2 mM
DTT - 65 mM
CHAPS - 65 mM
NDSB-256 - 0,15 M
Inhibidores de fosfatasas:
- Ortovanadato sódico - 1 mM
- Fluoruro de sodio - 0,1 mM
- Benzamidina - 1 mM

Trazas de azul de bromofenol

Tampón de equilibrado 2D-DIGE:
Tris pH 6,8 - 50 mM
Urea - 4 M
Tiourea - 2 M
Glicerol - 30% (v/v)
SDS - 2% (p/v)
Trazas de azul de bromofenol

Solución de almacenamiento:
Tris pH 8,8 - 0,375 M
SDS - 10% (v/v)

Tampón de electroforesis:
Tris BASE - 0,25 M
Glicina - 1,92 M
SDS - 1% (p/v)

Solución de fijación:
Metanol - 10% (v/v)
Ácido acético - 7% (v/v)

Tampón de transferencia:
Tris BASE - 0,025 M
Glicina - 0,191 M
Metanol - 20% (v/v)

Solución de bloqueo:
BSA - 5% (p/v)
Azida sódica - 0,1% (p/v)
TBS-T c.s.p.

Solución de retirada de anticuerpos:
Tris pH 6,7 - 63 mM
SDS - 2% (p/v)
β-mercaptoetanol - 0,7% (v/v)

Tampón fosfato salino o PBS 1X:
Cloruro sódico - 137 mM
Cloruro potásico - 2,7 mM
Fosfato disódico - 8,1 mM
Fosfato potásico monobásico - 1,76 mM

TBS-T:
Tris pH 7,6 - 0,02 M
Cloruro sódico - 0,137 M
Tween 20 - 1% (v/v)
pH 7,6

Tampón HEPES:
HEPES - 10 mM
Cloruro de potasio - 5 mM
Cloruro de magnesio - 1 mM
Cloruro de sodio - 136 mM
pH 7,4

Tampón HBSS suplementado:
HBSS comercial (Thermo Fisher)
HEPES - 20 mM
Cloruro de calcio - 1,5 mM de
BSA – 0,1 % (p/v)
pH 7,4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo II. Versiones extendidas de las tablas de características clínicas de los pacientes

Tabla suplementaria 1. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de MVs. Versión extendida.

Variable	IAMCEST (N=10)	CROIAMCEST (N=10)
Edad (años)	57 ± 14	61 ± 12
Mujeres (%)	30	30
Hx hipertensión arterial (%)	60	40
Hx diabetes mellitus (%)	30	20
Hx tabaquismo (%)	60	70
Hx dislipidemia (%)	40	60
Hx enfermedad coronaria (%)*	0	100
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0	10
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dl)	14,3 ± 1,9	13,6 ± 1,65
Leucocitos/µL*	11682,2 ± 2923	8082,1 ± 2576,8
Plaquetas/µL	260000 ± 81697,6	243600 ± 79933,6
Glucosa (mg/dl)*	137,2 ± 30,8	118,3 ± 57,9
Creatinina (mg/dl)	1 ± 0,3	1,4 ± 1,3
Colesterol (mg/dl)	181,1 ± 45	165,3 ± 29,4
Colesterol-LDL (mg/dl)	104,3 ± 40,7	81,6 ± 26,7
Colesterol-HDL (mg/dl)	42 ± 14	43,4 ± 15,3
Triglicéridos (mg/dl)	150,5 ±79,5	144 ± 76,9
Tratameintos crónicos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0
Estatinas (%)	70	70
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	100
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)	80	70
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	40	20
ACTP (%)	100	100

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx: Historia de; *: p<0,05.*

Tabla suplementaria 2. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el las validaciones del estudio de MVs. Versión extendida.

Variable	IAMCEST (N=15)	CROIAMCEST (N=13)
Edad (años)	65 ± 16	63 ± 14
Mujeres (%)	30	20
Hx hipertensión arterial (%) *	46,7	92,3
Hx diabetes mellitus (%)	40	20
Hx tabaquismo (%)	73,3	53,8
Hx dislipidemia (%)	53,3	53,8
Hx enfermedad coronaria (%)*	0	100
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0	0
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dl)	14,1 ± 2,4	15,3 ± 1,3
Leucocitos/µL	10426 ± 2839,9	9383,8 ± 2494,8
Plaquetas/µL	219357,1 ± 57911,9	225384,6 ± 51160,8
Glucosa (mg/dl)*	166,2 ± 47,1	126,2 ± 33,3
Creatinina (mg/dl)	0,96 ± 0,1	1 ± 0,3
Colesterol (mg/dl)*	144,9 ± 34,1	190,1 ± 31,3
Colesterol-LDL (mg/dl)*	78,7 ± 27,6	113,6 ± 31,6
Colesterol-HDL (mg/dl)	32,6 ± 7,9	33,6 ± 6,5
Triglicéridos (mg/dl)	179,7 ± 161,3	184,2 ± 103,4
Tratameintos crónicos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0
Estatinas (%)	73,3	76,9
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	100
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)	80	76,9
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	20	38,5
ACTP (%)	100	100

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx: Historia de; *: p<0,05.*

Tabla suplementaria 3. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio proteómico intracoronario. Versión extendida.

Variable	**IAMCEST (N =10)**
Edad (años)	67 ± 14
Mujeres (%)	50
Hx hipertensión arterial (%)	60
Hx diabetes mellitus (%)	30
Hx tabaquismo (%)	30
Hx dislipidemia (%)	40
Hx enfermedad coronaria (%)	0
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0
Parámetros de Laboratorio	
Hemoglobina (g/dl)	12,3 ± 2,5
Leucocitos/µL	11921,0 ± 6854,3
Plaquetas/µL	250500 ± 99850,2
Volumen plaquetar medio (fL)	8,7 ± 1,2
Glucosa (mg/dl)	108,6 ± 36,3
Creatinina (mg/dl)	1,2 ± 0,7
Colesterol (mg/dl)	155,1 ± 29,6
Colesterol-LDL (mg/dl)	91 ± 36,4
Colesterol-HDL (mg/dl)	41,5 ± 14,5
Triglicéridos (mg/dl)	112 ± 56,7
Tratamientos crónicos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	90
Otros antiplaquetarios (%)	10
Anticoagulantes (%)	10
Inhibidores ECA (%)	20
Antagonistas receptor de la angiotensina (%)	10
Estatinas (%)	90
Otros	
Ecocardiograma (%)	100
Coronariografía (%)	100
Enfermedad de un vaso (%)	70
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	60
ACTP (%)	100

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de.

Tabla suplementaria 4. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluídos en las validaciones del estudio intracoronario. Versión extendida.

Variable	**IAMCEST (N =11)**
Edad (años)	66 ± 13
Mujeres (%)	27,3
Hx hipertensión arterial (%)	54,5
Hx diabetes mellitus (%)	36,4
Hx tabaquismo (%)	45,5
Hx dislipidemia (%)	54,5
Hx enfermedad coronaria (%)	9,1
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0
Parámetros de Laboratorio	
Hemoglobina (g/dl)	12,3 ± 3,4
Leucocitos/µL	11634,5 ± 6435,3
Plaquetas/µL	248727,3 ± 74545,3
Volumen plaquetar medio (fL)	8,3 ± 1,3
Glucosa (mg/dl)	134,7 ± 49,3
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,6
Proteínas (mg/dl)	6 ± 0,8
Colesterol (mg/dl)	165,7 ± 46,5
Colesterol-LDL (mg/dl)	92,1 ± 36,3
Colesterol-HDL (mg/dl)	35,5 ± 9,4
Triglicéridos (mg/dl)	136,8 ± 49,0
Tratamientos crónicos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	81,8
Otros antiplaquetarios (%)	18,2
Anticoagulantes (%)	0
Inhibidores ECA (%)	18,2
Antagonistas receptor de la angiotensina (%)	9,1
Estatinas (%)	90,9
Otros	
Ecocardiograma (%)	100
Coronariografía (%)	100
Enfermedad de un vaso (%)	63,6
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	72,7
ACTP (%)	100

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de.

Tabla suplementaria 5. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio proteómico de la vía de señalización de GPVI. Versión extendida.

Variable	**IAMCEST (N =5)**	**CROIAMCEST (N =5)**
Edad (años)		
Mujeres (%)		
Hx hipertensión arterial (%)		
Hx diabetes mellitus (%)		
Hx tabaquismo (%)	80	80
Hx dislipidemia (%)		
Hx enfermedad coronaria (%)*		
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0	0
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dl)	14,8 ± 1	13,6 ± 2,1
Leucocitos/µL	8888 ± 2366,3	9100 ± 3333,9
Plaquetas/µL	269400 ± 114137,2	292200 ± 50642,9
Volumen plaquetar medio (fL)	8,5 ± 1,1	8,78 ± 0,7
Glucosa (mg/dl)	140 ± 31,4	110,2 ± 34,8
Creatinina (mg/dl)	1 ± 0,3	1 ± 0,1
Colesterol (mg/dl)	188 ± 59,4	161 ± 31,7
Colesterol-LDL (mg/dl)	109,4 ± 57,1	78,6 ± 26,4
Colesterol-HDL (mg/dl)	38,4 ± 15,3	47,8 ± 21,5
Triglicéridos (mg/dl)	167 ± 110,7	166 ±101,2
Tratamientos crónicos		
Aspirina (%)	100	
Clopidogrel (%)	100	
Otros antiplaquetarios (%)		
Anticoagulantes (%)	0	
Inhibidores ACE (%)	0	0
Inhibidores de los receptores de angiotensina (%)	0	0
Estatinas (%)	80	80
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	100
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)	60	80
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	80	20
ACTP (%)	100	100

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05.*

Tabla suplementaria 6. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio de validación de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión extendida.

Variable	**IAMCEST (N =14)**	**CROIAMCEST (N =11)**
Edad (años)	69 ± 14	64 ± 17
Mujeres (%)	21,4	9,09
Hx hipertensión arterial (%)	50	63,6
Hx diabetes mellitus (%)	35,6	18,2
Hx tabaquismo (%)	78,6	72,7
Hx dislipidemia (%)	64,3	54,6
Hx enfermedad coronaria (%)*	7,1	100
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0	0
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dl)	14,5 ± 14,2	14,5 ± 1,8
Leucocitos/µL	8767,7 ± 2209,6	8480,9 ± 2499,4
Plaquetas/µL	246538,5 ± 90981,6	244727,3 ± 57775,6
Volumen plaquetar medio (fL)	8,3 ± 1	8,5 ± 1
Glucosa (mg/dl)	147,3 ± 37,1	119,7 ± 39,9
Creatinina (mg/dl)	0,95 ± 0,2	1 ± 0,3
Colesterol (mg/dl)	159,4 ± 47,4	169,7 ± 30,9
Colesterol-LDL (mg/dl)	84,6 ± 42,5	86,8 ± 23,5
Colesterol-HDL (mg/dl)	37,1 ± 13,7	42,1 ± 15,5
Triglicéridos (mg/dl)	185,2 ± 178	203,5 ± 121,4
Tratamientos crónicos		
Aspirina (%)	100	100
Clopidogrel (%)	100	100
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0
Inhibidores ACE (%)	7,1	0
Inhibidores de los receptores de angiotensina (%)	0	9,1
Estatinas (%)	71,4	72,7
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	100
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)	64,3	90,9
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	42,9	36,4
ACTP (%)	100	100

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05.*

Tabla suplementaria 7. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST y controles CROIAMCEST incluidos en el estudio piloto de agregación tras la estimulación de GPVI realizado en plaquetas de sangre venosa. Versión extendida.

Variable	IAMCEST (N=5)	CROIAMCEST (N=5)
Edad (años)	73 ± 13	64 ± 15
Mujeres (%)	20	20
Hx hipertensión arterial (%)	20	20
Hx diabetes mellitus (%)	20	40
Hx tabaquismo (%)	60	40
Hx dislipidemia (%)	20	60
Hx enfermedad arterial coronaria (%)*	0	100
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0	20
Parámetros de laboratorio		
Hemoglobina (g/dl)	13,5 ± 1,2	12,5 ± 2,2
Leucocitos/µL	9066 ± 4775,9	7199,9 ± 1346,3
Plaquetas/µL	239000 ± 41364,2	187000 ± 61110,6
Volumen plaquetar medio (fL)	8,4 ± 2,0	8,8 ± 1,1
Glucosa (mg/dl)	112,8 ± 26,7	101,2 ± 15,1
Creatinina (mg/dl)	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,7
Colesterol (mg/dl)	163,6 ± 55,1	159,6 ± 87,0
Colesterol-LDL(mg/dl)	98,6 ± 62,0	105,0 ± 70,1
Colesterol-HDL (mg/dl)	37,6 ± 11,5	50,8 ± 15,4
Triglicéridos (mg/dl)	138,0 ± 67,5	114,4 ± 24,4
Tratamientos crónicos		
Aspirina (%)	80	100
Clopidogrel (%)	60	60
Otros antiplaquetarios (Ticagrelor) (%)	40	40
Anticoagulantes (%)	0	0
Estatinas (%)	80	100
Inhibidores ACE (%)	100	100
Inhibidores de los receptores de angiotensina (%)	20	20
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	80
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)	100	100
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	100	80
ACTP (%)	100	60

*Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y fueron comparadas utilizando el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar y fueron comparadas utilizando el test exacto de Mann-Whitney. Hx, Historia de; *, p<0,05.*

Tabla suplementaria 8. Características clínicas de los pacientes con IAMCEST incluidos en el estudio de la vía de señalización de GPVI realizado en plaquetas de sangre arterial. Versión extendida.

Variable	**IAMCEST (N=16)**
Edad (años)	67 ± 13
Mujeres (%)	37.5
Hx hipertensión arterial (%)	50
Hx diabetes mellitus (%)	31.25
Hx tabaquismo (%)	37.5
Hx dislipidemia (%)	50
Hx enfermedad arterial coronaria (%)	6.25
Hx enfermedad cerebrovascular (%)	0
Hx insuficiencia cardíaca (%)	0
Hx enfermedad arterial periférica (%)	0
Parámetros de laboratorio	
Hemoglobina (g/dl)	12,7 ± 2,9
Leucocitos/µL	11296,3 ± 5590,3
Plaquetas/µL	243187,5 ± 79313,1
Volumen plaquetar medio (fL)	8,5 ± 1,3
Glucosa (mg/dl)	126,3 ± 48,9
Creatinina (mg/dl)	1 ± 0,63
Colesterol (mg/dl)	162,9 ± 39,8
Colesterol-LDL(mg/dl)	93,5 ± 33,7
Colesterol-HDL (mg/dl)	38,6 ± 12,8
Triglicéridos (mg/dl)	159,7 ± 157,3
Tratamientos crónicos	
Aspirina (%)	100
Clopidogrel (%)	81,3
Otros antiplaquetarios (Ticagrelor) (%)	18,8
Anticoagulantes (%)	6,3
Estatinas (%)	18,8
Inhibidores ACE (%)	12,5
Inhibidores de los receptores de angiotensina (%)	87,5
Otros	
Ecocardiograma (%)	100
Coronariografía (%)	100
Enfermedad de un vaso (%)	68,8
Enfermedad de la arteria descendente anterior (%)	56,3
PTCA (%)	100

Las variables categóricas de los pacientes se expresan en porcentajes y las variables continuas se expresan como la media seguida de la desviación estándar. Hx, Historia de.

Anexo III. Lista de publicaciones realizadas durante el desarrollo de la presente tesis doctoral

Artículos que constituyen la presente tesis doctoral:

1. **Vélez P, Parguiña AF, Ocaranza-Sánchez R, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Alonso-Orgaz S, de la Cuesta F, Guitián E, Moreu J, Barderas MG, González-Juanatey JR, García Á.** Identification of a circulating microvesicle protein network involved in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2014;112(4):716-26. doi: 10.1160/TH14-04-0337.

2. **Vélez P, Izquierdo I, Rosa I, García Á**. A 2D-DIGE-based proteomic analysis reveals differences in the platelet releasate composition when comparing thrombin and collagen stimulations. *Sci Rep* 2015;5:8198. doi: 10.1038/srep08198.

3. **Vélez P, , López-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Bravo S, González-Juanatey JR, García Á.** 2D-DIGE-based proteomic analysis of intracoronary versus peripheral arterial blood platelets from acute myocardial infarction patients: upregulation of platelet activation biomarkers at the culprit site. *Proteomics Clin Appl* 2016. doi: 10.1002/prca.201500120 [Epub ahead of print].

4. **Vélez P, Ocaranza-Sánchez R, López-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Guitián E, García-Acuña JM, González-Juanatey JR, García Á.** A combination of proteomics, functional, and biochemical approaches demonstrates GPVI platelet signaling activation is increased in ST-elevation myocardial infarction patients. Submitted.

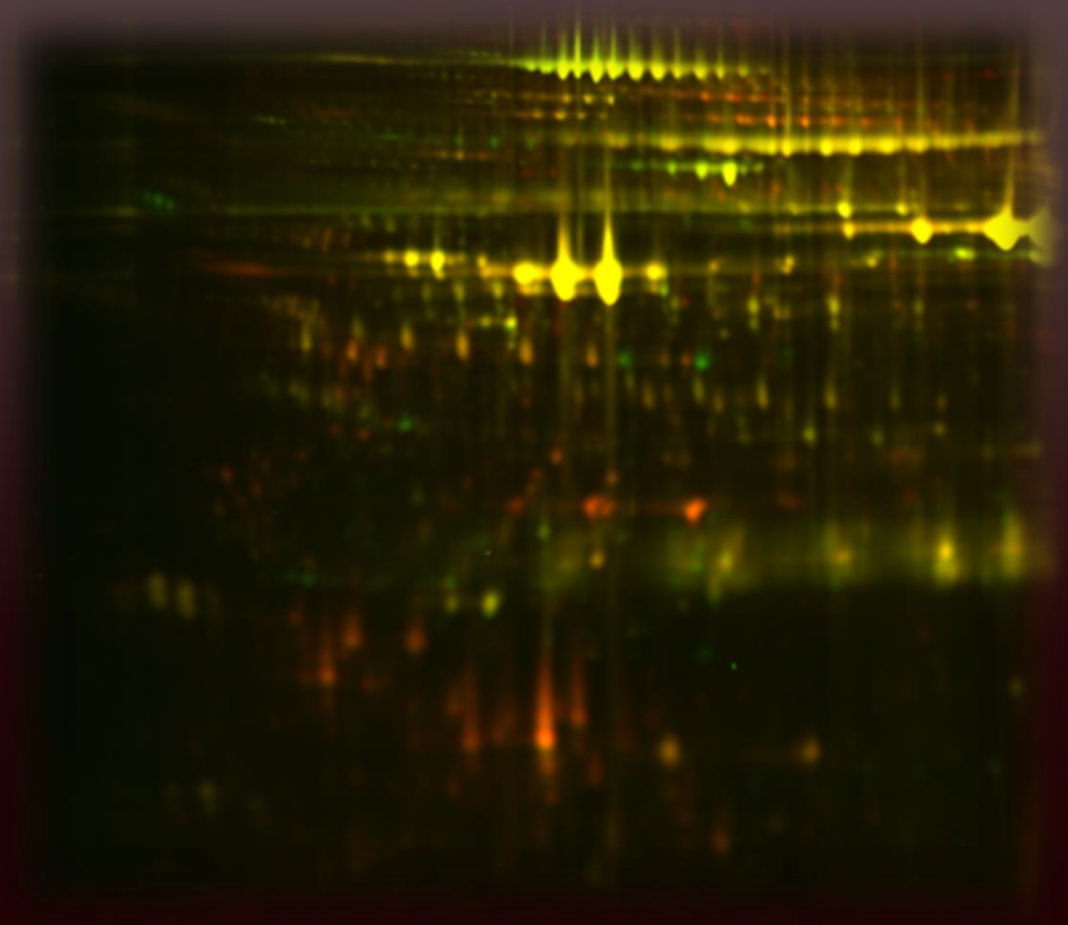
Otras publicaciones:

5. **Parguiña AF, Alonso J, Rosa I, Vélez P, González-López MJ, Guitián E, Eble JA, Loza MI, García Á.** A detailed proteomic analysis of rhodocytin-activated platelets reveals novel clues on the CLEC-2 signalosome: implications for CLEC-2 signaling regulation. *Blood* 2012;120(26):e117-26. doi: 10.1182/blood-2012-09-456004.

6. **Vélez P, García Á.** Platelet proteomics in cardiovascular disesases. *Transl Proteomics* 2015;7:15-29. doi:10.1016/j.trprot.2014.09.002.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA