

## LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCE LIBERACIÓN DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA POR LOS ERITROCITOS, AMPLIFICANDO EL RECLUTAMIENTO PLAQUETARIO

A. Moscardó, M.T. Santos, M. Piñón, A. Latorre, M.P. Fusset, S. Breña y J. Vallés

*Unidad de Aterosclerosis, Hemostasia, Trombosis y Biología Vascular. Centro de Investigación. Hospital La Fe. Valencia*

**Introducción:** La interacción eritrocito (RBC)-plaqueta incrementa la reactividad plaquetaria, efecto mediado por un aumento de liberación de ácido araquidónico (AA), TXA<sub>2</sub> y otros eicosanoides (1) y de un aumento en la concentración de ADP y ATP en los sobrenadante de co-estimulación celular (2). Por otra parte, el AA y el TXA<sub>2</sub> plaquetarios incrementan el calcio citosólico de los RBCs demostrando un proceso de señalización intercelular (3). Planteamos la hipótesis de que los liberados de plaquetas activadas puedan inducir la liberación de nucleótidos de adenina de RBCs intactos por mecanismos específicos de señalización.

**Métodos:** Plaquetas solas (PRP) o PRP+RBCs se estimulan con colágeno (1#m g/ml), y se centrifugan rápidamente (13.000 xg; 1 min.) para obtener un liberado celular (1-3). Estos liberados se añaden en proporción 1:1 (v/v) sobre RBCs normales o RBCs fijados con glutaraldehído (F-RBCs) (misma geometría que lo normales, pero metabólicamente inactivos y carentes de ATP). Estas suspensiones eritrocitarias se centrifugan como en la etapa anterior, obteniendo un liberado eritrocitario (L-RBC). Alícuotas de L-RBC se utilizan como inductores de agregación de plaquetas autólogas (reclutamiento) y/o para la cuantificación de nucleótidos de adenina por HPLC (2) o luciferin/luciferinasa.

**Resultados:** La concentración de ADP y ATP en los L-RBCs de eritrocitos normales expuestos al liberado de plaquetas activadas es significativamente mayor (50-80% de incremento; p = 0,000) al comparar con F-RBCs. Al utilizar el liberado procedente de la co-estimulación de PRP+RBCs, donde ya se producía un incremento significativo de ADP y ATP por los RBCs, la concentración de nucleótidos se amplifica por el contacto del liberado con los RBCs normales (50-70% de incremento; p = 0,00) vs F-RBCs. Estos experimentos demuestran que los RBCs incrementan los nucleótidos de adenina en dos niveles: a) en la fase de contacto célula-célula con las plaquetas y b) por liberación directa al ser expuestos al liberado de plaquetas activadas. Estos nucleótidos liberados tienen un efecto biológico muy notable en lo que se refiere a su capacidad proagregatoria (reclutamiento). La estimulación selectiva de RBCs normales con distintas sustancias componentes del liberado de plaquetas activadas indica que los eicosanoides pueden jugar un papel importante en la liberación de nucleótidos por los eritrocitos.

**Conclusiones:** Los liberados de activación plaquetaria, no solo inducen el reclutamiento de otras plaquetas circulantes en el trombo en formación, sino que además inducen señalización bioquímica en los RBCs que responden con liberación de ADP y ATP de modo selectivo y en ausencia de lisis celular. Los nucleótidos liberados por los RBCs amplifican el reclutamiento plaquetario en la fase fluida y pueden contribuir al mantenimiento del tono vascular.

1. Santos MT *J Clin Invest* 1991;87:571-80
  2. Valles J *Blood* 1991;78:154-162
  3. Valles J. et al *Blood* 2002;99:3978-84.
- FISS 03/0270, C03/06