

Mecanismos moleculares involucrados en las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en acidosis

Etulain J¹, Carestia A¹, Rivadeneyra L¹, Fondevila C², Schattner M¹

¹Laboratorio de Trombosis Experimental, IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, Argentina.

²Servicio de Hematología. Clínica Bazterrica. Buenos Aires, Argentina.

mschattner@hematologia.anm.edu.ar, mschattner@hotmail.com

Trabajo premiado con Mención Especial en el
X Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis

Fecha de recepción: 28/01/2012
Fecha de aprobación: 26/02/2013



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 17 N° 1: 15-20
Enero-Abril, 2013

RESUMEN

La acidosis es una característica del microambiente inflamatorio presente en situaciones de injuria vascular, tumor, aterosclerosis y enfermedades inflamatorias pulmonares. Las plaquetas además de ser elementos claves en la hemostasia y la trombosis, también juegan un rol importante en estas patologías. En estudios previos mostramos que el descenso del pH apaga las funciones hemostáticas de las plaquetas y promueve respuestas inflamatorias mediadas por la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos. Mientras la fosforilación de algunas moléculas involucradas en la activación plaquetaria (Src, Akt y ERK) fue significativamente inhibida en acidosis, la activación de p38 o NFκB no fue modificada o aumentó respectivamente, con el descenso del pH. El incremento en la expresión de P-selectina observado en acidosis se mantuvo en presencia de inhibidores de Src (PP1), PI3K/Akt (Ly294002) y ERK (U0126). Este fenómeno tampoco fue modificado por la incubación individual de las plaquetas con bloqueantes de p38 (SB203580) o NFκB (Ro1069920), pero sí disminuyó significativamente ante la presencia simultánea de ambos inhibidores. En concordancia con el aumento en la expresión de P-selectin, la formación de agregados plaquetas-leucocitos, así como la migración de leucocitos en presencia de plaquetas, aumentó en acidosis y ambos fenómenos fueron revertidos por la presencia conjunta de SB203580 y Ro1069920.

Estos resultados indican que las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en condiciones de acidosis requieren la activación simultánea de p38 y NFκB y plantean la posibilidad de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la inflamación.

Palabras clave: plaquetas, p-selectina, inflamación, acidosis

SUMMARY

Acidosis is one of the hallmarks of the inflammatory microenvironment present in situations of vascular injury, tumor, atherosclerosis and inflammatory lung diseases. In addition to its key role in hemostasis and thrombosis, platelets also play an important role in these pathologies. Our previous studies showed that acidosis dampens platelet haemostatic functions, and promotes inflammatory responses mediated by P-selectin expressed on the platelet surface. In this study we examined the molecular mechanisms involved in these processes. While phosphorylation of some molecules involved in platelet activation (Src, Akt y ERK) was significantly inhibited by acidosis, the activation of p38 or NFκB was not modified or even increased respectively, with the decrease in pH. The increased expression of P-selectin observed in acidosis remained in the presence of inhibitors of Src (PP1), PI3K/Akt (Ly294002), and ERK (U0126). In addition, this phenomenon was not modified by platelets incubation with blockers of p38 (SB203580) and NFκB (Ro1069920), but decreased significantly in the simultaneous presence of both inhibitors. Accordingly with the augmented P-selectin expression, the formation of platelet-leukocyte aggregates, as well as leukocyte migration in the presence of platelets, were increased by acidosis and both cellular processes were reversed by the combined presence of SB203580 or Ro1069920. Together, these results indicate that inflammatory responses mediated by platelet in acidic conditions require simultaneous activation of p38 and NFκB, and raise the possibility of new therapeutic targets for the treatment of inflammation.

Key words: platelets, p-selectin, inflammation, acidosis

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del pH intracelular es esencial para la homeostasis celular ya que numerosos procesos vitales dependen de esta característica. El pH normal de la sangre es aproximadamente 7.4¹, sin embargo, las plaquetas pueden estar expuestas a condiciones ácidas en una gran variedad de patologías incluyendo aterosclerosis, isquemia, enfermedades infecciosas, como así también artritis reumatoidea, asma y tumores²⁻⁵. Las plaquetas, además de ser elementos claves en la hemostasia y la trombosis, también juegan un rol importante en la patogénesis de estas enfermedades⁶. Los primeros estudios sobre el efecto del pH ácido en la fisiología plaquetaria datan de tres décadas atrás y sólo han tenido como objetivo definir las condiciones óptimas para la técnica de agregación plaquetaria y el manejo de concentrados plaquetarios con fines transfusionales⁷⁻⁹. Sin embargo, no se conoce de qué manera el descenso del pH modula las respuestas inflamatorias mediadas por las plaquetas. En este contexto, nuestros estudios previos demostraron que el pH ácido inhibe la función hemostática de las plaquetas, pero promueve las respuestas inflamatorias mediadas por la P-selectina expresada en la superficie, incluyendo la interacción plaqueta-leucocitos, plaqueta-endotelio y la migración leucocitaria¹⁰. En este trabajo nos propusimos profundizar estos hallazgos evaluando los mecanismos moleculares involucrados en las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en acidosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras. Las plaquetas y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se obtuvieron de sangre periférica anticoagulada con citrato de sodio (3,8%), proveniente de donadores voluntarios sanos concurrentes al Hospital Juan A. Fernández, que no hubiesen tomado ninguna medicación 10 días previos a la extracción. Los procedimientos realizados así como también el consentimiento informado otorgado por los donadores fueron aprobados por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina y por el Hospital Fernández. **Purificación de plaquetas, condiciones de acidosis y estimulación.** El plasma rico en plaquetas (PRP) fue centrifugado en presencia de prostaciclina (PGI₂, Cayman Chemical) (75nM). Luego del lavado, las plaquetas fueron resuspendidas a 4x10⁵ plaquetas/μl e incubadas en *buffer* Tyrode a pH 7.4, 7.0 y 6.5 (15 min) previamente ajustado con el agregado de HCl isotónicamente. Las plaquetas fueron incubadas con CaCl₂ (1 mM, 1

min) y estimuladas con trombina (0.05U/ml, 5 min) (Enzyme Research Laboratories)¹⁰. **Inmunoblot.** Las plaquetas estimuladas a los distintos pH fueron lisadas y la activación de las quinasas Src, Akt, ERK y p38, se determinó por Western blot mediante el empleo de anticuerpos que reconocen específicamente los sitios de fosforilación activos de dichas moléculas (Santa Cruz Biotechnology). La activación de NFκB fue determinada de manera indirecta por la degradación de su inhibidor IκBα (anticuerpo de BD Biosciences). Las membranas fueron escaneadas en un Scan ColorPage-Vivid 1200XE #2 y cuantificadas con el software GEL-PRO analyzer 3.1. **Inhibición farmacológica.** Las plaquetas lavadas fueron pre-incubadas durante 30 min con bloqueantes irreversibles de distintas vías de activación plaquetaria incluyendo quinasas Src (PP1, 5μM), PI3K/Akt (Ly294002, 10μM), ERK (U0126, 10μM), p38 (SB203580, 25μM) o NFκB (Ro1069920, 3μM) (BD Biosciences). Luego, las plaquetas fueron centrifugadas en presencia de PGI₂ (75nM) y resuspendidas en *buffer* Tyrode a pH 7.4, 7.0 y 6.5 (15 min) y estimuladas con trombina (0.05U/ml, 5 min) en presencia de CaCl₂ (1mM). **Expresión de P-selectina.** Las plaquetas pre-incubadas con los inhibidores y estimuladas a los distintos pH fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) (1%) y marcadas con el anticuerpo CD62P-FITC (anti-P-selectina) o con su respectivo isotipo (BD Biosciences). La exposición de P-selectina en la superficie plaquetaria fue determinada por citometría de flujo¹⁰. **Purificación de PMN y condiciones de acidosis.** Luego de la extracción del PRP, los PMN fueron aislados mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque 1.077 g/cm³ (Sigma) y posterior sedimentación con dextrán 6% (Pharmacia). Después de la lisis de los glóbulos rojos, los PMN se resuspendieron en *buffer* Tyrode a pH 7.4, 7.0 o 6.5 y se ajustaron a una relación PMN-plaquetas (1:40)¹⁰. **Respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas.** Las plaquetas tratadas con bloqueantes de NFκB (Ro1069920) y p38 (SB203580), lavadas y resuspendidas en los distintos pH, fueron incubadas con PMN y luego estimuladas o no con trombina (0.05 U/ml, 5 min). Las muestras fueron fijadas y marcadas con los anticuerpos específicos de plaquetas y PMN (CD61-PE y CD45-FITC, respectivamente, BD Biosciences) y se determinó la formación de agregados por citometría de flujo. El porcentaje de agregados plaquetas-PMN fue calculado como eventos CD45+/CD61+ dentro de la población de CD45+. La quimiotaxis de PMN fue inducida por el péptido bacteriano, fMLP-1, en una cámara de migración estática y luego de la tinción con hematoxilina/eosina se determinó por microscopía, el número de PMN que migraron

a través de una membrana de policarbonato ubicada en el interior de la cámara¹⁰. **Análisis estadístico.** Los resultados fueron expresados como la Media±EE y analizados mediante ANOVA empleando el test de comparaciones múltiples Newman-Keuls. Valores de P < 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Efecto de la acidosis en las vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria

Durante el proceso de activación plaquetaria se fosforilan diversas moléculas incluyendo las quinasas Src, el eje PI-3K/Akt, y las quinasas p38 y ERK, ambas miembros de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (11). Considerando que este fenómeno cumple un papel principal en la transducción de señales en las plaquetas, se evaluó el efecto de la acidosis en la activación de dichas proteínas mediante Western blot. A diferencia de las plaquetas en reposo, las formas fosforiladas de Src, Akt, ERK y p38 fueron detectadas en las plaquetas estimuladas con trombina a pH fisiológico. La fosforilación de Src, Akt, ERK pero no la de p38 fue significativamente inhibida por el descenso del pH (Figura 1).

Las plaquetas a pesar de ser células anucleadas, expresan al factor de transcripción NFκB, molécula crítica en la regulación de la transcripción de proteínas inflamatorias¹². Si bien el rol no genómico de esta molécula no ha sido completamente dilucidado, nuestro grupo y otros han demostrado que participa en diversas respuestas de activación plaquetaria^{13, 14}. De esta manera, en los siguientes experimentos evaluamos el efecto de la acidosis en la activación del NFκB plaquetario. En condiciones de reposo, el NFκB

se encuentra en el citosol en forma inactiva formando un complejo con su inhibidor la proteína IκBα. Como se observa en la Figura 1, mientras que en las plaquetas no activadas se detectó la presencia de IκBα, los niveles de esta proteína disminuyeron luego del agregado de trombina debido a la degradación de esta molécula. Este fenómeno fue significativamente mayor con el descenso del pH indicando que la acidosis promueve la activación del NFκB mediada por trombina.

Mecanismos moleculares involucrados en el aumento de la expresión de P-selectina y en las respuestas inflamatorias asociadas en acidosis

Habiendo demostrado que la acidosis regula diferencialmente las vías de señalización involucradas en el activación plaquetaria y con el fin de caracterizar los mecanismos que regulan el aumento de P-selectina en medio ácido, en los siguientes experimentos se determinó por citometría de flujo, la expresión de P-selectina en plaquetas pre-incubadas con inhibidores de las diferentes vías de señalización. Si bien cada inhibidor fue capaz de disminuir parcial y significativamente la expresión de P-selectina comparado con el control sin droga (Figura 2), la inhibición de Src, Akt y ERK no tuvo efecto sobre el aumento de P-selectina observado en acidosis, indicando que estas vías no estarían involucradas en este fenómeno. Además, la inhibición individual de p38 y NFκB tampoco fue capaz de revertir el aumento de P-selectina en acidosis. Sin embargo, considerando que en un trabajo previo demostramos que la acción conjunta, pero no individual, de p38 y NFκB modula la expresión de P-selectina en condiciones inflamatorias¹⁵, repetimos los experimentos bloqueando simultáneamente ambas vías. En la Figura 2 se puede observar que el aumento de P-selectina mediado por la acidosis fue totalmente

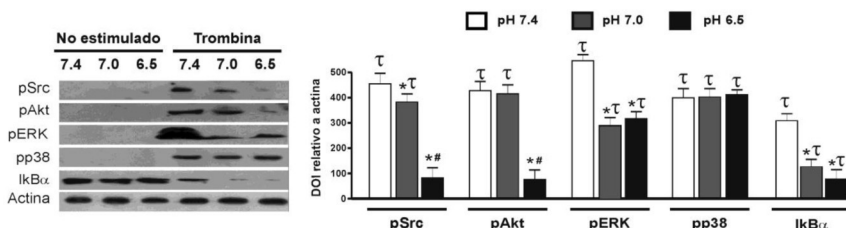


Fig. 1.- Efecto de la acidosis en las vías de señalización plaquetarias. Las plaquetas estimuladas con trombina a los distintos pH fueron lisadas y se determinó por Western blot la activación de las quinasas Src, Akt, ERK y p38 por fosforilación, y la de NFκB por la degradación de su inhibidor IκBα. La intensidad de densidad óptica (DOI) de las bandas en las membranas fue cuantificada con un software y relativizada a actina como control de carga. El gráfico de barras muestra el promedio ± EE de la densitometría de bandas correspondientes a las plaquetas estimuladas (n=3, t p< 0,05 vs. No estimulado; *p <0.05 vs. pH 7.4; #p <0.05 vs. pH 7.0).

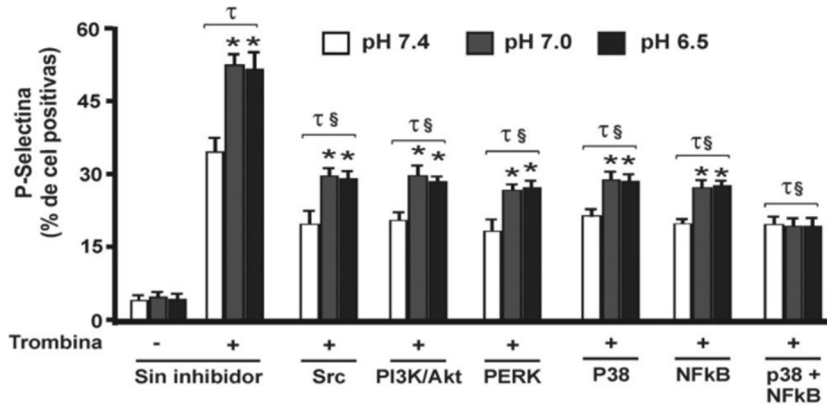


Fig. 2.- Inhibición de la expresión de P-selectina. Las plaquetas fueron pre-incubadas con inhibidores de las vías de señalización indicadas, lavadas, expuestas a los distintos pH y estimuladas. Se procedió a la marcación de P-selectina en la superficie plaquetaria y al análisis por citometría de flujo ($n=4$, $t < 0,05$ vs. No estimulado; * $p < 0,05$ vs pH 7.4; § $p < 0,05$ vs sin inhibidor).

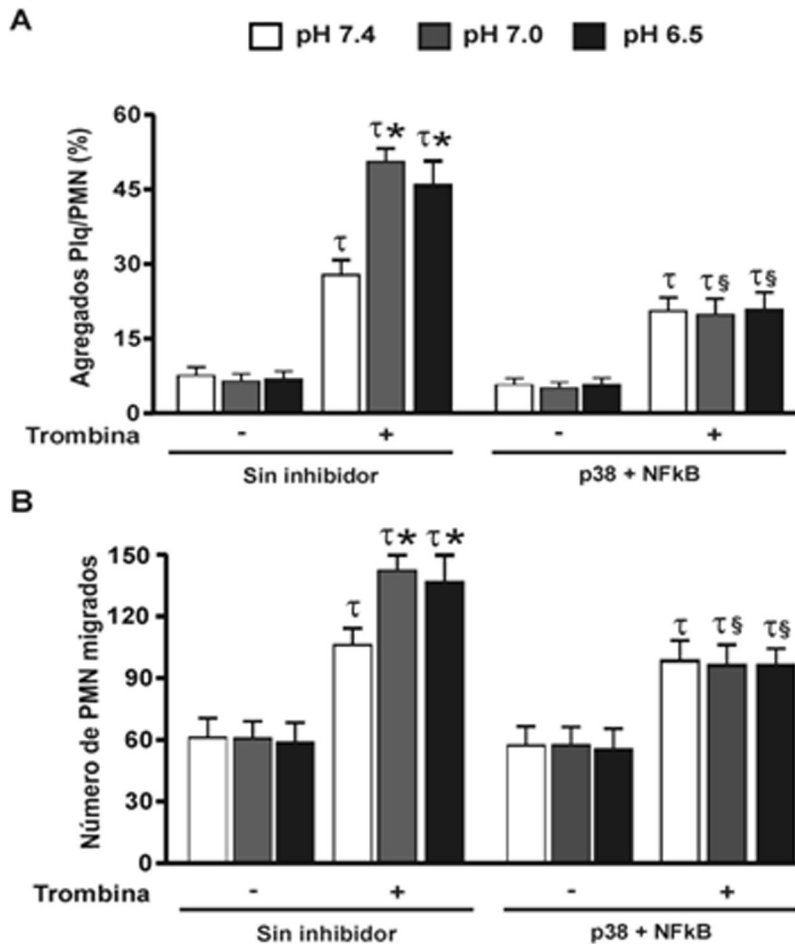


Fig. 3.- Respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en acidosis. Las plaquetas fueron pre-incubadas o no con bloqueantes de p38 y NFκB, lavadas, expuestas a los distintos pH, incubadas con leucocitos PMN y luego estimuladas o no con trombina. A) La formación de agregados plaqueta (Plq)-PMN fue determinada por citometría de flujo ($n=5$). B) La quimiotaxis de PMN en presencia de plaquetas fue determinada en una cámara de migración estática y cuantificada por microscopía ($n=5$, $t < 0,05$ vs. Sin estimular; * $p < 0,05$ vs. pH 7.4; § $p < 0,05$ vs Sin inhibidor).

revertido en plaquetas pre-tratadas conjuntamente con inhibidores de p38 y NFκB.

Una de las principales respuestas inflamatorias mediadas por la expresión de P-selectina en la membrana plaquetaria es favorecer el reclutamiento de leucocitos al foco inflamatorio. Este proceso secuencial implica adhesión de plaquetas al endotelio, interacción plaqueta-leucocito, y migración de leucocitos circulantes hacia los tejidos⁶. Dado que previamente mostramos que, en concordancia con la expresión de P-selectina, la formación de agregados plaqueta-leucocitos y la migración de leucocitos en presencia de plaquetas activadas, aumentan significativamente a pH 7.0 y 6.5 analizamos el rol de p38 y NFκB plaquetarios en estos fenómenos. Como se observa en la Figura 3, el aumento tanto en la generación de agregados mixtos como en la migración de leucocitos en medio ácido, fue completamente prevenido por el bloqueo de p38 y NFκB.

DISCUSIÓN

Recientemente analizamos la funcionalidad de las plaquetas en un microambiente ácido. En este contexto, demostramos que el pH ácido inhibe la función homeostática de las plaquetas pero, promueve las respuestas inflamatorias mediadas por la P-selectina expresada en la superficie plaquetaria¹⁰. En el presente trabajo describimos los mecanismos moleculares responsables de gatillar dichos procesos. Demostramos que la acidosis modula diferencialmente las vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria inhibiendo la fosforilación de las quinasas Src, Akt y ERK, pero sin modificar la activación de p38 o aumentando la de NFκB. Interesantemente, la inhibición conjunta de p38 y de NFκB suprimió el aumento en la expresión de P-selectina plaquetaria en acidosis, como así también las respuestas inflamatorias mediadas por esta molécula, incluyendo la interacción plaqueta-leucocito y la migración de leucocitos. Estos hallazgos indican que ambas moléculas serían las vías de señalización responsables de amplificar las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en condiciones de acidosis.

Dado que las plaquetas contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades caracterizadas por un microambiente inflamatorio a través de la P-selectina, se ha postulado a esta molécula como blanco terapéutico de dichas enfermedades^{6, 16}. En este contexto, en la última década se han diseñado diversos inhibidores incluyendo anticuerpos y péptidos bloqueantes del ligando de esta selectina, que se encuentran en etapa pre-clínica o en fase I-II de

desarrollo¹⁶. Sin embargo, existen diversos desafíos en la implementación de antagonistas de P-selectina que incluyen dificultades técnicas para la síntesis de dichas moléculas¹⁶, discrepancias observadas entre estudios clínicos y pre-clínicos¹⁷, y escasa información acerca de efectos adversos y diversidad de enfermedades a tratar debido a la incipiente aparición de estas drogas. Además de bloquear la acción de esta molécula, otra potencial estrategia sería evitar su expresión para lo cual resulta indispensable un profundo conocimiento de las vías de señalización que regulan este proceso, no solamente en condiciones fisiológicas sino particularmente en situaciones patológicas. En este contexto, nuestros resultados demuestran que la activación conjunta de p38 y NFκB son las responsables del aumento de la expresión de P-selectina plaquetaria y de las respuestas inflamatorias mediadas por esta molécula en condiciones de acidosis extracelular. Si bien estos resultados deberán ser extendidos a modelos *in vivo*, sugieren que estas moléculas podrían ser consideradas en futuros estudios como posibles blancos terapéuticos de patologías inflamatorias relacionadas con la activación de plaquetas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marumo M, Suehiro A, Kakishita E, et al. Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca(2+) entry. **Thromb Res** 2001 Dec 1; 104(5): 353-60.
2. DeClerck K, Eible RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. **Front Biosci** 2010; 15: 213-25.
3. Huang Y, McNamara JO. Ischemic stroke: "acidotoxicity" is a perpetrator. **Cell** 2004 Sep 17; 118(6): 665-6.
4. Lim S. Metabolic acidosis. **Acta Med Indones** 2007 Jul-Sep; 39(3): 145-50.
5. Ricciardolo FL, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. **J Allergy Clin Immunol** 2004 Apr; 113 (4): 610-9.
6. Etulain J, Schattner M. Current viewpoints on platelet contribution to inflammation. **World J Hematology** 2012; 1(4): 14-21.
7. Patscheke H. Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. **Haemostasis** 1981;10(1):14-27.
8. Rogers AB, Des Prez RM. The effect of pH on human platelet aggregation induced by epinephrine and ADP. **Proc Soc Exp Biol Med** 1972 Apr; 139 (4): 1100-3.
9. Watts SE, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Storage of platelets for tests of platelet function: effects of pH on platelet aggregation and liberation of beta-thromboglobulin. **Thromb Res** 1983 Feb 1; 29(3): 343-53.
10. Etulain J, Negrotto S, Carestia A, et al. Acidosis downregulates platelet haemostatic functions and promotes neutrophil proinflammatory responses mediated by platelets. **Thromb Haemost** 2012 Jan; 107(1): 99-110.
11. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2010 Dec; 30 (12): 2341-9.

12. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev** 2012 Feb 1; 26 (3): 203-34.
13. Malaver E, Romaniuk MA, D'Atri LP, et al. NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses. **J Thromb Haemost** 2009 Aug; 7 (8): 1333-43.
14. Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, et al. Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2010 Mar; 30 (3): 591-8.
15. Etulain J, Laponi MJ, Patrucchi SJ, et al. Hyperthermia inhibits platelet haemostatic functions and selectively regulates the release of alpha-granule proteins. **J Thromb Haemost** 2011 Jun 7; 9 (8): 1562-71.
16. Woollard KJ, Chin-Dusting J. P-selectin antagonism in inflammatory disease. **Curr Pharm Des** 2010; 16 (37): 4113-8.
17. Romano SJ. Selectin antagonists: therapeutic potential in asthma and COPD. **Treat Respir Med** 2005; 4 (2): 85-94.