



ORIGINAL

Efecto del cizallamiento y del difosfato de adenosina sobre la activación plaquetaria y la formación de microagregados en controles sanos. Valoración mediante citometría de flujo

Sandra Dolz Giménez y Marcial Martínez Silvestre*

Unidad de Citometría de Flujo, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

Recibido el 2 de diciembre de 2008; aceptado el 18 de mayo de 2009

Disponible en Internet el 7 de julio de 2009

PALABRAS CLAVE

Activación plaquetaria;
Citometría de flujo;
Cizallamiento

Resumen

Introducción: Diversos estudios demuestran que las velocidades de cizallamiento elevadas provocan activación plaquetaria. Sin embargo, no está descrito cómo se comportan las plaquetas activadas por cizallamiento ante estímulos posteriores. No está bien establecido si las plaquetas después de activarse por cizallamiento en el flujo sanguíneo in vivo responden más o menos a la subsiguiente acción de agonistas fisiológicos, como el ADP (*adenosine diphosphate* 'difosfato de adenosina'). Ésta es la cuestión abordada en el presente estudio, en el que se remedan in vitro las condiciones del flujo sanguíneo en las arterias no estenóticas.

Material y métodos: Se valora la activación plaquetaria mediante citometría de flujo. El cizallamiento se induce en un viscosímetro de cono y plato a una velocidad de 230 s^{-1} , que remeda el cizallamiento fisiológico del flujo sanguíneo en las arterias sanas. Como marcadores de activación se determinan el antígeno CD62, el complejo glucoproteínas IIb/IIIa en su forma activa y la formación de los microagregados plaquetarios (MAP).

Se valora el porcentaje de plaquetas activadas espontáneamente y el número de los MAP. Seguidamente, se valora el porcentaje de las plaquetas activadas y los MAP tras estimular con ADP. En paralelo, se sigue el mismo procedimiento, pero se somete previamente la sangre a cizallamiento durante 5 min. En estas muestras cizalladas se valora el porcentaje de las plaquetas activadas y los MAP antes y después de estimular con ADP.

Resultados: El cizallamiento, así como el ADP, aumentan el porcentaje de las plaquetas activadas en la sangre. Cuando las plaquetas cizalladas se someten ulteriormente al ADP, el porcentaje de las plaquetas que se activan resulta significativamente menor que cuando el ADP estimula directamente las plaquetas en la sangre sin cizallar.

Conclusiones: Las plaquetas sometidas a cizallamiento resultan refractarias a activarse subsiguientemente por acción de los agonistas, mientras que las plaquetas no cizalladas

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: martinez_mar@gva.es (M. Martínez Silvestre).

KEYWORDS

Platelet activation;
Flow cytometry;
Shearing

responden adecuadamente a éste. Esta respuesta refractaria *in vitro* puede representar un mecanismo de defensa celular que podría evitar *in vivo* un mayor grado de activación y agregación cuando las plaquetas se enfrentan a un agonista fisiológico en zonas donde aumenta el cizallamiento de la sangre circulante.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Effect of shear rate and adenosine diphosphate on platelet activation and microaggregate formation. Evaluation by flow cytometry

Abstract

Introduction: Several studies show that high shear rate cause platelet activation. But the behaviour of these activated platelets by shear and subsequent stimulus by, for example, ADP is not well established. This paper investigates an *in vitro* model of blood flow conditions in non-stenotic arteries.

Material and methods: Platelet activation is studied by flow cytometry. The shear is induced in a cone-plate viscometer at 230 s^{-1} that mimics the blood flow conditions in healthy arteries. CD62 and GpIIb/IIIa in their active form are selected as platelet activation markers, as well as for the formation of platelet microaggregates (MAP).

The percentage of spontaneously activated platelets and the number of MAP are determined. The percentage of activated platelets and MAP after stimulating with ADP is then evaluated. In parallel, the same procedure is followed, but after previously subjecting blood samples to a shear for 5 min. In these sheared samples the percentage of activated platelets and MAP also are measured before and after stimulating with ADP.

Results: Shearing, as well as ADP, increases the percentage of activated platelets in whole blood. When the platelets are subsequently subjected to ADP, the percentage of activated platelets is significantly lower than when the ADP directly stimulates platelets without shearing.

Conclusions: Platelets subjected to shearing become refractory when they are subsequently activated by action of a physiological agonist such as ADP. However the platelets that are not sheared respond appropriately to this agonist. This refractory response *in vitro* may represent a cellular defence mechanism to prevent a greater degree of *in vivo* activation-aggregation when platelets are faced with an agonist in areas where the shear rate increases in the blood flow.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Actualmente está bien establecido el papel de las plaquetas en la patogénesis de la aterotrombosis, proceso en el que desempeñan un papel fundamental. La activación del complejo glucoproteínas (GP) IIb/IIIa interviene en la primera fase de la agregación plaquetaria por interacción con diversos ligandos solubles, principalmente fibrinógeno y factor de von Willebrand¹⁻³. La agregación de las plaquetas sometidas a baja velocidad de cizallamiento (0 a 1.000 s^{-1}) depende, fundamentalmente, del fibrinógeno²; en tanto que cuando se exponen a un elevado cizallamiento (1.000 a 10.000 s^{-1}) depende en mayor medida del factor von Willebrand^{4,5}, lo que demuestra que el proceso de formación de los microagregados plaquetarios (MAP) es función de las condiciones del flujo. El proceso inicial de agregación puede conducir a la formación de los MAP y microtrombos ricos en plaquetas. La exposición de CD62 en la superficie plaquetaria estabiliza este microtrombo inicial y permite su posterior crecimiento y la formación de agregados de plaqueta y leucocito^{6,7}. La acumulación de plaquetas activadas en el sitio de rotura de una placa aterosclerótica es el hecho patogénico clave que facilita la formación del

trombo arterial. En la activación de las plaquetas, necesaria para que se produzcan estos fenómenos, intervienen numerosos factores, entre los que pueden citarse la acción de agonistas fisiológicos y la velocidad de cizallamiento (*shear rate*) causada por el propio flujo sanguíneo al pasar por una arteria estenótica⁸.

Entre los agonistas fisiológicos que actúan sobre las plaquetas, el ADP (*adenosine diphosphate* 'difosfato de adenosina') desempeña un importante papel *in vivo* en la hemostasia normal y en la trombosis. Aunque el ADP se considera un agonista débil, en comparación con la trombina o el colágeno, resulta un cofactor necesario para la activación de las plaquetas por parte de otros agonistas, por lo que es de gran interés valorar su acción sobre la activación de las plaquetas. Está bien establecido que esta acción, consistente fundamentalmente en inducir la formación de agregados, se ejerce fundamentalmente a través de los 2 principales receptores plaquetarios de ADP^{9,10}.

Actualmente hay un creciente interés en la valoración de la función plaquetaria bajo diferentes condiciones de flujo. Según los diversos autores, el cizallamiento per se puede activar las plaquetas^{7,11,12}. La mayoría de los investigadores que trabajan en este campo someten las plaquetas a

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2578514>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2578514>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)