Angiología. 2013;65(5):175–182

Angiología

www.elsevier.es/angiologia

ARTÍCULO ESPECIAL

La plaqueta como célula inflamatoria: modificación de la expresión proteica del citoesqueleto y sistema contráctil de la pared vascular

S. González Sánchez[a,*], G. Moñux Ducajú[a], J. Modrego Martín[b], F.J. Serrano Hernando[a] y A.J. López Farré[b]

[a] *Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España*
[b] *Laboratorio de Investigación Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España*

Recibido el 28 de enero de 2013; aceptado el 14 de marzo de 2013
Disponible en Internet el 2 de mayo de 2013

PALABRAS CLAVE
Pared vascular;
Endotelio;
Plaqueta;
Aterosclerosis;
Proteómica;
Citoesqueleto;
Sistema contráctil

Resumen A pesar de su sencillez estructural, las plaquetas son células funcionalmente muy complejas debido a su capacidad para producir y liberar biomoléculas. De aquí su importancia en el desarrollo de la arteriosclerosis. Se realizó un experimento in vitro para estudiar la actividad de las plaquetas sobre la pared vascular observando los cambios en la expresión proteica del citoesqueleto en segmentos de aorta bovina incubados con plasma rico en plaquetas. Para intentar simular un estado inflamatorio (arteriosclerosis), se realizaron estas mismas determinaciones en segmentos preestimulados con factor de necrosis tumoral. Se observó una modulación de la expresión de la mayoría de las proteínas del citoesqueleto en los segmentos de aorta sana. Sin embargo, en los segmentos preestimulados el número de proteínas fue menor, pudiendo reflejar una capacidad dual de las plaquetas para alterar la contractilidad vascular en función del estado inflamatorio de la pared vascular.
© 2013 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS
Vascular wall;
Endothelium;
Platelet;
Atherosclerosis;
Proteomics;
Cytoskeleton;
Contractile system

The platelet as a inflammatory cell: modification of cytoskeletal and contractile protein expression of the vascular wall

Abstract Despite its structural simplicity, platelets are functionally complex cells due to their ability to produce and release biomolecules. Hence its importance in the development of atherosclerosis. An *in vitro* experiment was conducted to study the effect of the platelets on the vascular wall by observing changes in the cytoskeletal protein expression in bovine aortic segments incubated with platelet rich plasma. With the aim of simulating an inflammatory state (atherosclerosis), these same measurements were performed on aortic segments pre-stimulated with tumour necrosis factor. We observed a modulation of the expression of most of the cytoskeletal proteins in healthy aorta segments. However, the number of modified proteins was less

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: saragonzalezsanchez@gmail.com (S. González Sánchez).

0003-3170/$ - see front matter © 2013 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
http://dx.doi.org/10.1016/j.angio.2013.03.007

in pre-stimulated segments. These results may reflect a dual platelet capacity to alter vascular contractility in relation to the inflammatory condition of the vascular wall.
© 2013 SEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

En la última década se han realizado grandes avances en el estudio de la arteriosclerosis como una enfermedad inflamatoria[1]. De hecho, hasta no hace mucho tiempo, el concepto de la plaqueta dentro de la arteriosclerosis era el de una *célula* involucrada en los estadios finales de la placa de ateroma, es decir, en la activación de la coagulación tras la rotura de la misma[2]. Sin embargo, poseemos una creciente evidencia de la contribución de las plaquetas en la arteriosclerosis a través de la interacción con la pared vascular y otros tipos celulares mediante mecanismos paracrinos y autocrinos que condicionan un círculo de amplificación de la respuesta inflamatoria[3].

Actualmente poseemos un conocimiento extenso de los efectos que ejerce el endotelio sobre las plaquetas[4], pero son muy limitados lo estudios que examinan el efecto contrario, el de las plaquetas sobre la expresión proteica de la pared vascular[5]. En este sentido, existen estudios *in vitro* que señalan que las plaquetas pueden inducir un proceso inflamatorio en cultivos de células endoteliales (CE)[4]. Del mismo modo, existen estudios *in vivo* que demuestran cómo las plaquetas, bajo condiciones inflamatorias, pueden modular la expresión de proteínas asociadas al proceso inflamatorio[6].

La disfunción endotelial que inicia la placa de ateroma se caracteriza por un aumento de la permeabilidad de la pared vascular vinculado a un proceso de desorganización del citoesqueleto celular[7]. El citoesqueleto y el sistema contráctil no solo poseen una mera acción estructural, sino que se les atribuye una función como reguladores del medio ambiente celular[8]. Además, el citoesqueleto tiene la capacidad de responder a estímulos extracelulares, como son los productos plaquetarios, y llevar a cabo una reestructuración[9].

El objetivo de nuestro estudio experimental fue determinar si las plaquetas eran capaces de producir cambios en la expresión proteica de la pared vascular utilizando la proteómica para monitorizar dichas variaciones.

Material y método

Muestras de aorta bovina

Se obtuvieron segmentos de aorta torácica de origen bovino, que se manipularon en condiciones de esterilidad y se dividieron cuidadosamente para preservar el endotelio intacto. Posteriormente fueron cultivados a 37 °c en una atmósfera con 95% de oxígeno, 5% de dióxido de carbono con el medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado con suero fetal bovino, glutamina (5 mmol/l), penicilina (2×10^{-5} μg/l) y estreptomicina (2×10^{-5} μg/l).

Con el objetivo de inducir un estado inflamatorio similar al que acontece en la arteriosclerosis, 33 fragmentos de aorta bovina fueron estimulados incubándolos durante 6 h con 10 ng/ml de la citocina factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), como se ha publicado con anterioridad[10].

Aislamiento del plasma rico en plaquetas

Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de voluntarios sanos con una edad media de 35 ± 8 años para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Se excluyeron aquellos individuos que habían tomado antiagregantes o antiinflamatorios las 2 semanas previas a la obtención de la muestra. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Institucional del Hospital Clínico San Carlos.

El protocolo para la obtención del PRP ya ha sido publicado por otros autores con anterioridad[6,11,12], siendo de gran importancia evitar grandes fuerzas mecánicas como la agitación. Se añadió un 10% del anticoagulante citrato-dextrosa y se centrifugó a 800 g y 20 °C durante 15 min. Para obtener las distintas concentraciones de plaquetas utilizadas en el experimento (como se indica posteriormente) se diluyó el PRP con plasma pobre en plaquetas (PPP), que se obtuvo centrifugando el PRP a 2.500 rpm durante 10 min. El número de plaquetas se cuantificó con un contador celular.

Protocolo de coincubación

En los experimentos de coincubación (cocultivos) se utilizaron 2 concentraciones de plaquetas diferentes: 10^5 plaquetas por pocillo (plaq/poc), considerada una concentración fisiológica, y 10^7 plaq/poc, que se asemejaría a la concentración de plaquetas existente en el trombo plaquetario y, por tanto, una situación patológica.

El sistema de coincubación se realizó utilizando unas membranas semipermeables de tipo Corning®-Transwell®-COL (Corning incorporated, COSTAR3491,NY), que permitieron cultivar las muestras de aorta y las plaquetas sin estar en contacto directo y, por tanto, permitió estudiar la interacción entre ellas a través de la liberación de mediadores (fig. 1). El tamaño del poro fue de 0,4 μm para evitar la migración de las plaquetas, ya que estas poseen un diámetro de 1-3 μm[13]. El experimento llevado a cabo se detalla en la figura 2. Se utilizaron 31 segmentos controles, los cuales fueron incubados con PPP.

La coincubación fue de una hora para evitar la activación espontánea de las plaquetas[14]. Después se retiró el sistema de membranas que contenía las plaquetas y se cultivaron las muestras de aorta 23 h más a 37 °C.

Determinación de las proteínas del citoesqueleto y sistema contráctil

Para la determinación de las proteínas de las muestras se utilizó la proteómica, técnica que permite el análisis de la

Download English Version:

https://daneshyari.com/en/article/2867824

Download Persian Version:

https://daneshyari.com/article/2867824

Daneshyari.com