



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**RELACIÓN ENTRE PLAQUETAS Y LA INMUNOTROMBOSIS E
INMUNOINFLAMACIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: CLAUDIO IGNACIO MARTÍNEZ HENRÍQUEZ
PROFESOR GUIA: MARCELO ALARCÓN LOZANO**

**TALCA-CHILE
Año 2022**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

Dedicatoria

Esta memoria me gustaría dedicársela a mi familia, en especial a mis padres que estuvieron junto a mi para darme los ánimos y experiencia para llegar a este punto.

Agradecimientos

Al igual que en mi dedicatoria, quiero agradecer a mis padres por guiarme en el camino correcto a pesar de todas las dificultades. Además, agradecer a mis amigos, sin Javier, Sebastián y Marcia hubiera dejado esta memoria a medio terminar. Por último, agradecer a mi profesor guía, Marcelo Alarcón por entregarme ánimos, ayuda y humanidad para que esta memoria quedara de una manera correcta. Muchísimas gracias a todos.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	3
4. Metodología de búsqueda y organización de la información	3
5. Marco Teórico	4
5.1. Función plaquetaria.....	4
5.2. CD40L	12
5.3. Células inmunes y su interacción con plaquetas activadas	15
5.4. Formación de NETs	23
5.5. Plaquetas activadas y formación de NETs.....	27
5.6. Interacciones en trombosis.....	31
5.6.1. Tromboinflamación.....	31
5.6.2. Tromboembolismo venoso.....	34
5.7. Aterosclerosis y trombosis.....	37
6. Conclusiones	40
7. Bibliografía	41

Índice de figuras

1. Marco teórico	4
1.1. Función plaquetaria	4
1.1.1. Figura 1. Receptores plaquetarios y moléculas implicadas en plaquetas	6
1.1.2. Figura 2. Adhesión primaria de plaquetas y posterior activación	7
1.1.3. Figura 3. Promedio de concentración de citoquinas en plaquetas	9
1.1.4. Figura 4. Receptores de membrana presentes en plaqueta	11
1.2. CD40L	12
1.2.1 Figura 5. Efecto de señalización CD40-CD40L	14
1.2.2 Figura 3. Adhesión de leucocito en tejido endotelial	9
1.2.3 Figura 4. Leucocitos y su interacción en la coagulación	9
1.3. CD40L	10
1.3.1 Figura 5. Efecto de señalización CD40-CD40L	11
1.4. Células inmunes y su interacción con plaquetas activadas	15
1.4.1 Figura 6. Adhesión de neutrófilos a tejido endotelial por P-selectina	16
1.4.2 Figura 7. Métodos de adhesión de leucocitos al tejido endotelial	18
1.4.3 Figura 8. Leucocitos y su interacción en la coagulación	19
1.4.4 Figura 9. Efecto de la interacción IL1R1/IL-1 β en plaquetas	21
1.5. Formación de NETs	23
1.5.1 Figura 10. Estructura de NETs activadas por IL-8	24
1.5.2 Figura 11. Estímulos inductores de NETosis en plaquetas	25
1.6. Plaquetas activas y formación de NETs	27
1.6.1 Figura 12. Activación plaquetaria, unión a neutrófilo y NETosis.	28
1.6.2 Figura 13. Adhesión de plaquetas en plasma perfundido con NETs	30
1.7. Interacciones en trombosis	31
1.7.1 Tromboinflamación	31

1.7.1.1 Figura 14. Mecanismo de tromboinflamación en accidentes cerebrovasculares	33
1.7.2 Tromboembolismo venoso	34
1.7.2.1 Figura 15. Formación de NETs en TVP	37

Índice de tablas

1. Marco teórico	4
1.1. Función plaquetaria	4
1.1.1. Tabla 1. Principales citoquinas presentes en α -gránulos	9
1.2. Formación de NETs	23
1.2.1. Comparación de los tipos de formación de NETs	27

1. Resumen

Es esencial para la hemostasis y la coagulación sanguínea la plaqueta, fragmentos celulares de pequeño tamaño proveniente de una célula hematopoyética llamada megacariocito. La activación plaquetaria puede producirse rápidamente para la reparación de heridas, por medio de adhesión a endotelio y liberación de citoquinas por medio de una serie de distintos gránulos, con la finalidad de producir quimiotaxis, en donde puede agregarse con otras plaquetas e incluso con células inmunes como neutrófilos generando un trombo estable. No obstante, esta no es la única función descrita en la literatura, se han descrito mecanismos en donde la plaqueta puede activarse en procesos inflamatorios y cumple roles importantes para la inmunidad adaptativa, liberando citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6.

De la misma forma en que las plaquetas pueden activar células del sistema inmune en una inflamación, puede esto ocurrir en dirección contraria, vale decir, ocasiones en donde el sistema inmune es capaz de generar una activación plaquetaria a nivel general, desencadenando en formaciones de trombos a lo largo del sistema circulatorio, donde las interacciones entre las plaquetas y los neutrófilos y el mecanismo por el cual este puede generar una respuesta inmune se convierte en un requisito obligatorio para la prevención de patologías asociadas, como se puede apreciar en casos con pacientes donde ocurre el proceso conocido como NETosis, donde las NETs, generadas por neutrófilos frente a un daño endotelial, inmunotrombosis y aterosclerosis

Palabras claves: plaqueta, sistema inmune, trombo, citoquinas, NETosis, inmunotrombosis

2. Introducción

Es indispensable la actividad plaquetaria para los procesos de coagulación frente a un daño en los tejidos endoteliales. Las plaquetas cumplen la función más crítica de la hemostasia para generar coágulos sanguíneos (1). Pero las plaquetas no son las únicas células implicadas en este proceso, otro factor importante a considerar y que está ganando cada vez más importancia en el ámbito científico y de investigación, son las células del sistema inmune, donde la plaqueta y leucocitos se activan entre ellas consiguiendo que las células del sistema inmune participen activamente en la hemostasia (2). Variados estudios apoyan esta afirmación, viendo como las plaquetas secretan citoquinas y quimiocinas como CCL5 y CXCL7 por medio de gránulos, los cuales inician el reclutamiento de neutrófilos en la zona afectada (3), además la plaquetas cumplen funciones de sitios de acoplamiento de las células inmunes en el endotelio (2). Por otro lado, células como los monocitos expresan factor tisular, tanto en su membrana como en microvesículas, lo que contribuye en gran medida a la coagulación y formación de trombos (2).

Estas conexiones se pueden apreciar en distintas enfermedades como infecciones bacterianas, como el caso de infecciones pulmonarias de *Pseudomonas aeruginosa* (1), aterotrombosis en sepsis y en eventos cardiovasculares agudos (2), algunos cánceres que al liberar factores agonistas de la coagulación genera trombos en circulación, conocido como agregación plaquetaria inducida por células tumorales (4), la cual esta última está siendo estudiada a fondo debido a sus implicancias con el virus SARS-COV-2 por expresión de factor tisular de monocitos, lo cual se presentó en pacientes que requerían ventilación mecánica invasiva o que evolucionaron con mortalidad hospitalaria (5). Por ende, estudiar en esta interacción entre plaquetas y leucocitos, conocer el mecanismo y entender como ocurre esta interacción es de vital importancia para el entendimiento de la relación de las plaquetas con las células del sistema inmune.

3. Objetivos

Objetivo general:

- Definir la interacción que ocurre entre las plaquetas y el sistema inmune en la formación de trombos y en los procesos inflamatorios.

Objetivos específicos:

- Explicar las principales vías de comunicación entre las plaquetas y las células del sistema inmune y sus cascadas metabólicas.
- Relacionar la activación plaquetaria con la activación de células polimorfonucleares para ocasionar una reacción inmune
- Mencionar los principales factores de riesgos que pueden ocasionar una inmunotrombosis

4. Metodología de búsqueda y organización de la información

Para realizar la búsqueda de la información, se utilizaron las páginas “Google academics”, “ScienceDirect” y “web of science”, encontrando documentos científicos en revistas como “Blood Reviews”, “Cellular & Molecular Immunology”, “Blood”, “Platelets”, entre otras. Se realizaron búsquedas tales como “platelet immune function”, “platelet adhesion”, “immune coagulation”, “platelet activation”, “platelet α -granule”, “coagulation factors”, “CD40 effects in platelets”, “IL-1 β effect in platelets”, entre otros.

Para realizar la organización de la revisión bibliográfica se usaron diferentes documentos Word, además de Excel, con la finalidad de organizar de mejor manera el documento final, además de que el texto sea cohesivo. Para realizar las citas en la bibliografía se utilizó programas como “EndNote”

5. Marco Teórico

5.1. Función plaquetaria

El proceso de la hemostasis es clásicamente conocido por la interacción de las plaquetas con el tejido subendotelial, al ser dañado los vasos sanguíneos con el fin de mantener el sistema circulatorio con presiones altas en presencia de un daño (6). Para realizar este proceso de hemostasia, una de las glucoproteínas principales es el factor Von Willebrand (VWF) (7) participa en la adhesión plaquetaria por medio del complejo GP Ib/V/IX y GP VI (8). En un cizallamiento, la interacción de VWF y GP Ib/V/IX es la más predominante para la adhesión, (9). La subunidad de unión a ligandos del complejo del receptor GPIb/IX/V, GPIb α , contiene sitios de unión para el dominio A1 de VWF en su dominio NH2-terminal mediando la adhesión dependiente del flujo de plaquetas al subendotelio vascular a través de su dominio A1 (10). Por otro lado GPIb/IX interactúa con P-selectina, con los factores XI y XII, cininógenos de alto peso molecular y trombospodina-1, logrando que sea importante no solo para la adhesión, sino para reclutamiento leucocitario en lesiones vasculares (11). La unión de vWF a GPIb/IX/V transmite señales intracelulares, lo que desencadena la desgranulación, la elevación de iones calcio citosólico, reordenamientos del citoesqueleto-actina, y activación "inside out" de α Ib β 3 que se une al vWF o al fibrinógeno y media la agregación plaquetaria (12). Entre las moléculas mediadas por la activación plaquetaria por GPIb/IX podemos encontrar la vía de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3-quinasa) proteína quinasa b (AKT), las vías de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía FCR γ -SYK/PLC γ 2 (13) y genera activación débil a través de una serie de proteínas citoplasmáticas, incluidas las proteínas que contienen el motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) (14). 14-3-3 ζ , otra molécula adaptadora, asociada funcionalmente con GP Ib/V/IX y participa en la activación "inside out" de α Ib β 3 (14).

Se puede reconocer a su vez a GPVI, que juega un papel predominante en la interacción inicial al colágeno (15). Es un receptor con dominios Ig presente en la membranas de plaquetas y megacariocitos como monómero o dímero, cada cadena con una copia de ITAM (16). El colágeno se une a la forma dimérica, pero no monomérica de GPVI, y que solo la primera es capaz de atenuar la agregación plaquetaria inducida por colágeno, pero tanto la forma monomérica como la dimérica de GPVI se pueden unir a convulxina inmovilizada e inhiben la agregación plaquetaria inducida por la toxina de serpiente con dependencias de concentración similares (15). Con la activación de ITAM mediado por miembros de la quinasa de la familia Src, Fyn y Lyn y a su vez, a través de la señalización de Syk/LAT, inducen la activación de PLC- γ 2 y los consiguientes eventos posteriores. Tras la activación de GPVI en las plaquetas, Syk se incorpora a la membrana a través de sus dos dominios SH2 que se unen a dos motivos fosfo-ITAM en el dominio citoplasmático de FcR que son fosforilados por SFK (17). De forma simplificada esto se puede apreciar en la figura 1.

Por otro lado nos encontramos con CLEC-2 es una proteína de membrana de tipo II con un dominio de reconocimiento extracelular similar a un carbohidrato (similar a CRD) expresado en gran medida en el linaje de megacariocitos/plaquetas y en niveles más bajos en neutrófilos circulantes, donde puede mediar la producción de citoquinas proinflamatorias, incluido TNF- α , en respuesta al ligando de CLEC-2, la rodocitina (18). Curiosamente, en contraste con los agonistas de GPVI, encontramos que la activación de Syk y PLC2 mediada por CLEC-2, regulada por la cascada metabólica de PI3K de CLEC-2 (17). CLEC-2 señala a través de las tirosina quinasas Src y Syk que conducen a la fosforilación de tirosina y al reclutamiento de proteínas adaptadoras, tirosina quinasas de la familia Tec y varias proteínas efectoras, incluidas PI3K, Vav, Rac1 y PLC γ 2 (19). Además, como es el caso de GPVI, varias de estas proteínas son críticas para la activación, como Syk y PLC γ 2, mientras que el papel de otros puede superarse a concentraciones más altas

de agonistas, incluidos LAT y Gads, que desempeñan funciones muy similares a las de GPVI en la regulación de PLC γ 2 (15).

Dado que la mayoría de los receptores acoplados a las proteínas G o la actividad de tirosina quinasa son capaces de inducir una hidrólisis significativa de PIP2 y, por lo tanto, la activación de PKC, se ha propuesto que PKC media muchas de estas señales (20). La PKC participa principalmente en la formación de trombos en la forma activada de las plaquetas y no en la forma en reposo; la participación de las PKC en la formación de trombos es crucial debido a su papel en la promoción de la secreción y la activación de integrinas que son obligatorias para la agregación plaquetaria. Por lo tanto, las propiedades proagregantes y procoagulantes de los trombos son significativamente controlado por la vía PKC (21) (22).

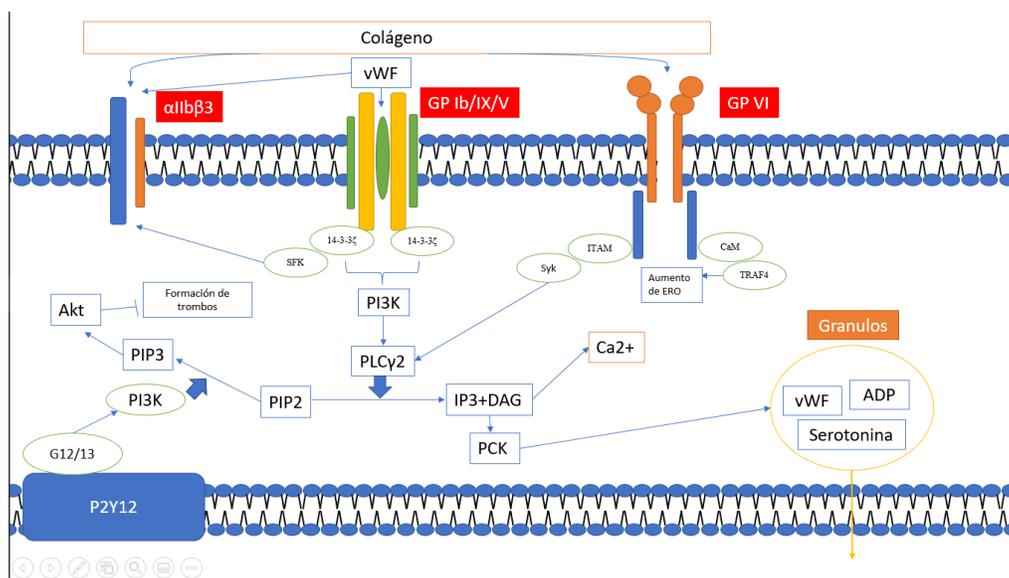


Figura 1. Receptores plaquetarios y moléculas implicadas en plaquetas. Cascada metabólica y segundos mensajeros más comunes en la activación plaquetaria por medio de las glicoproteínas GPIb/IX/V, VI e integrina α I**II** β 3. Elaboración propia.

Cuando la plaqueta se encuentra activada por los métodos descritos, esta empieza realizar procesos oxidativos de ácidos grasos libres, siendo el más común el ácido araquidónico (AA), lo cual termina con la formación de prostaglandina E₂ y tromboxano A₂ (TxA₂), agonistas de la coagulación. (23). Además, las plaquetas activadas, por medio de la movilización de calcio (24), se secretan gránulos densos que contienen ADP, calcio, epinefrina y otras 200 moléculas pequeñas y α -gránulos que contienen proteínas más complejas, como P-selectina. (10). Una integrina importante para este proceso es GPIIb/IIIa (25), la cual en circulación se encuentra en reposo, encontrándose con una baja afinidad a su ligando, el fibrinógeno, para evitar la agregación plaquetaria en condiciones normales, pero en el momento de un daño endotelial, la plaqueta se activa por medio de unión al tejido subendotelial, agonistas como ADP, trombina, colágeno y epinefrina, convierten esta GPIIb/IIIa de baja afinidad a una de alta afinidad como lo representa la figura 2 (26).

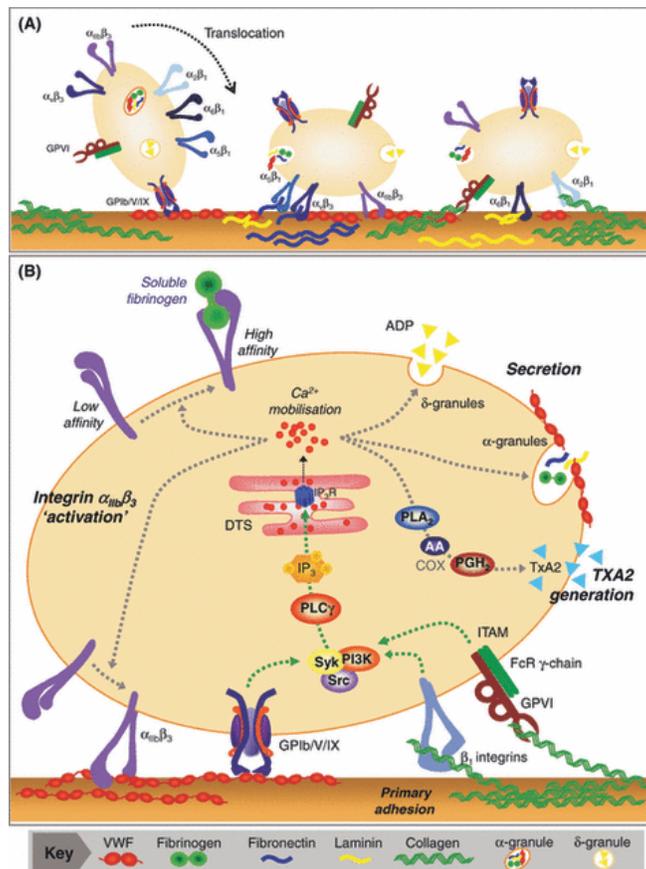


Figura 2. Adhesión primaria de plaquetas y posterior activación. Adhesión y activación plaquetaria por medio de colágeno y VWF, interactuando con integrinas plaquetarias para la subsecuente activación de factores agonistas de la coagulación. Tomado de: Wei AH. et. Al. 2009 (24).

A este proceso le sigue una serie de cambios a cofactores, enzimas y sustratos, llamada coagulación o hemostasia secundaria, donde podemos encontrar 2 principales cascadas, la vía intrínseca y la vía extrínseca de la coagulación, las cuales se pueden medir *in vitro* por medio de las pruebas de tiempo de activación parcial de tromboplastina (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP) (27). La vía extrínseca y la más importante *in vivo* es cuando una glicoproteína expresada en superficie de fibroblastos y en células dañadas o estimuladas, llamada factor tisular (TF) se une con el factor VII activado (FVIIa), formando un complejo que activa a los factores IX y X, siendo este último el encargado de generar la reacción de protrombina a trombina, el agonista más potente de la coagulación, capaz de generar fibrina a partir de fibrinógeno y junto al factor XIII activado (FXIIIa) generar un trombo estable. (14). La otra vía, con menor importancia *in vitro*, es la vía intrínseca la cual puede generarse por falta de complejo TF-VIIa o una fibrinólisis parcial (14). Este proceso inicia con la activación del factor XII, seguida de una serie de activaciones enzimáticas, llegando finalmente a la activación del FX, empezando la vía común (28).

El descubrimiento de que los gránulos densos de plaquetas contienen polyP y lo secretan al activarse junto con el hecho de que los pacientes con formación anormal de gránulos densos tienen niveles más bajos de polyP plaquetario y presentan diátesis hemorrágica (29). El polifosfato extracelular derivado de plaquetas (PolyP) es un importante mediador de la hemostasia, la trombosis y la inflamación vascular y es un objetivo terapéutico prometedor (30). En plasma humano y de ratón, el polyP aislado fue capaz de soportar la activación de FXII a una concentración superior a 2 $\mu\text{g/ml}$ fue capaz de escindir el FXII y la precalicreína del plasma, así como el sustrato del FXIIa, el FXI (31).

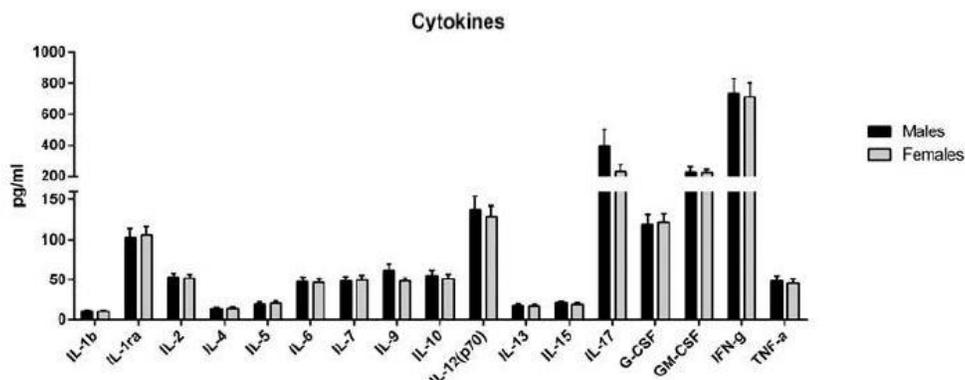


Figura 3. Promedio de concentración de citoquinas en plaquetas. Promedio de concentraciones en pg/ml de diferentes citoquinas de muestras de PRP de 6 hombres y 10 mujeres de 20 a 40 años voluntarios sanos. Tomado de: Mussano F. 2016 (32).

Tabla 1: Principales citoquinas presentes en α -gránulos plaquetarios. Tomada y adaptada de Zhang J-M. (2007) (33)

Citoquinas	Fuente principal	Actividad primaria
IL- β	Células presentadoras (APC)	Hematopoyesis
IL-6	Células Th2 activadas, APC, otras	Respuesta de fase aguda, proliferación de células B, trombopoyesis, sinérgica con IL-1 y TNF
	Célula somática	Células T
IL-12	Células B, macrófagos	La proliferación de células NK, producción de IFN, promueve las funciones inmunes mediadas por células.
IFN- γ	Células Th1 y NK activadas	Induce MHC de clase I en todas las células somáticas, induce MHC de clase II en APC y somáticas

		células, activa macrófagos, neutrófilos, células NK, promueve la inmunidad mediada por células
		efectos antivirales
TNF- α	macrófagos, mastocitos, NK	Muerte celular, inflamación, dolor.
	células, neuronas sensoriales	
GM-CSF	Células Th	Crecimiento y diferenciación de monocitos y células dendríticas.

Las plaquetas no solo liberan citoquinas por medio de gránulos como los expresados en la figura 3 y la tabla 1, sino que también presentan una gran cantidad de receptores de membrana sensibles a este tipo de proteínas, tales como distintos receptores de tipo Toll (TLRs, como TLR1, 2, 4 y 6 en superficie y TLR3, 7 y 9 en endosomas) reaccionando con LPS (34), receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLRs) siendo NLR3 y en menor medida NALP y NALP2 mediador de la activación de caspasa 1, uniéndose a citoquinas pro-inflamatorias como proIL1 β generando su forma madura activada, siendo IL-1 β (35) y receptores de lectina tipo C (CLRs), que son activados por PAMP y DAMP, además de glicoproteínas y glicolípidos, además de cumplir un rol importante en la trombosis patológica, más específicamente en casos de HIV y DENV (36).

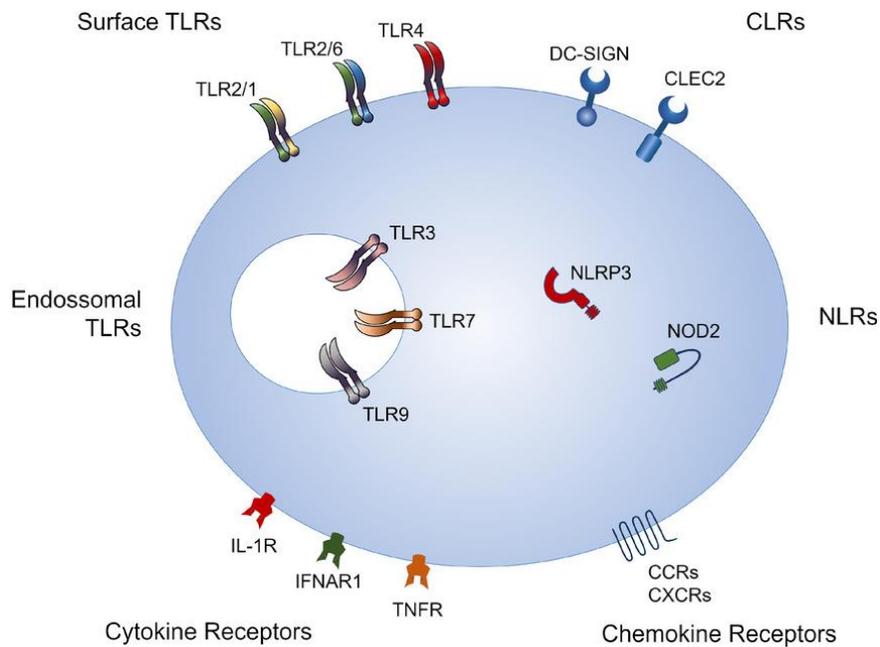


Figura 4. Receptores de membrana presentes en la plaqueta. Receptores de membrana presentes en plaquetas organizados en diferentes grupos: Toll Like Receptors (TLR) de superficie y endosomal, receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLRs), receptores de quimioquinas y receptores de citocinas. Tomado de: Ribeiro B. 2020 (36).

La activación plaquetaria es un requisito previo para su alta producción de CD40L por medio de gránulos, junto a ADP, serotonina, P-selectina y α -trombina (37). El CD40L se expresa principalmente por las células T activadas, así como por las células B y las plaquetas activadas, mientras que las plaquetas inactivadas expresan niveles bajos de CD40L. De manera significativa, la activación de las plaquetas está asociada con la señalización de PI3K/PKB/Akt (38). Las plaquetas con el ligando CD40 de superficie (CD40L; también conocido como CD154). La mayoría (> 95 %) del CD40L soluble en plasma (sCD40L) se deriva de las plaquetas y el sCD40L mejora la activación plaquetaria

en un circuito de autoamplificación, lo que conduce a una mayor agregación de plaquetas e interacciones entre plaquetas y leucocitos (39).

5.2. CD40L

CD40L es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) encontrándose altamente expresada en células T activadas o diferenciadas y en plaquetas activadas, en forma soluble y se encuentra esta proteína débilmente expresada en macrófagos no-activados, neutrófilos y células endoteliales (40). CD40, también miembro de la superfamilia de receptores TNF, es una proteína transmembrana altamente expresada en células T, células dendríticas, monocitos, plaquetas, macrófagos, células del musculo liso, células endoteliales y fibroblastos. Presenta mayor afinidad a CD40L, pero puede unirse y ser regulada por TNF- α , IL-1, IFN- γ , entre otras (41). El CD40 funcional presumiblemente actúa como un receptor trímero con un dominio conservado en la región extracelular media un ensamblaje específico de trímeros de receptores independiente de ligandos. Este dominio de ensamblaje previo a la unión del ligando es físicamente distinto del dominio que forma los principales contactos con el ligando, pero es necesario y suficiente para el ensamblaje del receptor que se une al ligando y media la señalización (42). CD40 activa a segundos mensajeros, como proteínas tirosina-quinasa, PI3K, PCL γ 2 y serino/treonina proteína quinasa, terminando con la activación de barrios factores de la transcripción de factores como NF-kB y moléculas similares como p50, p65, cRel (43).

CD40 se expresa ampliamente en células no hematopoyéticas, incluidas células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales (44). Al producirse la unión CD40-CD40L, se

genera una señalización que trae como consecuencias la regulación de la activación de células T y la producción de citoquinas siendo esto una parte fundamental en el proceso inflamatorio (45). Plaquetas que presentan CD40L inducen a células epiteliales a secretar IL-8 y CCL-2, además de otras moléculas de adhesión como E-selectina, VCAM e ICAM-1, causando un reclutamiento de leucocitos y una formación de agregado plaqueta-leucocito en el área afectada por una inflamación vascular (46). Esta activación es mediada por células inmunes mediadas por CD40L, complejos de integrina como $\alpha_5\beta_1$ y Mac-1 o por integrinas específicas para trombocitos como el receptor GPIIb/IIIa (45). CD40L plaquetario interactúa con el CD40 de las células endoteliales vecinas y, al mismo tiempo, con el CD40 de los monocitos atrapados en el trombo. Tanto en las células endoteliales como en los monocitos, esta interacción probablemente desencadene inmediatamente una respuesta inflamatoria (47) como se presenta en la figura 5.

CD40 en células B, monocitos/macrófago y células dendríticas es expresado en su forma de proteína de membrana al inducirse una señal de “peligro” inducida por patrones moleculares asociado a patógeno (PAMP) como lipopolisacáridos (LPS), y patrones moleculares asociados a patógenos (DAMP) como la proteína B1 de alta movilidad (HMGB1) (48).

En la célula T activada libera CD40L soluble e induce la formación de CD40L de membrana cuando se producen estímulos a través de receptores de linfocito T (TCR), células co-estimuladoras, y citoquinas inflamatorias como la IL-12 (48). Por otro lado, la expresión de CD40L en plaquetas se presenta también en su estado activado, donde luego de un estímulo como trombina, colágeno o ADP más adrenalina, CD40L de membrana es rápidamente expresada, mientras que CD40L soluble es liberada, generando una regulación negativa de CD40L (48). El CD40 se regula al alza en varios trastornos inflamatorios y, a través de la participación de ligandos, el CD40 desencadena respuestas proinflamatorias en las células endoteliales, las células del músculo liso vascular y las células epiteliales que

desempeñan un papel clave en la patogenia de diversos trastornos, como la enfermedad inflamatoria intestinal y el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, rechazo de injertos y aterosclerosis (49)

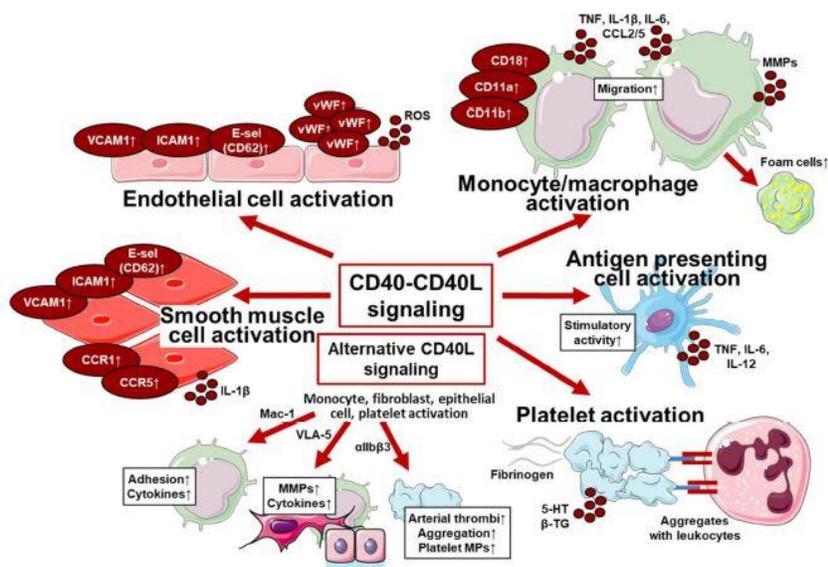


Figura 5. Efectos de señalización CD40-CD40L. Efectos de la señalización de CD40-CD40L en distintos tipos de células, como tejido endotelial, monocito/macrófago, célula dendrítica, plaqueta, fibroblasto, endotelio y células del músculo liso. Tomado de: Daub S. 2020 (45).

Las plaquetas expresan TRAF-1, -2 y -6 y que la unión de sCD40L induce el reclutamiento de TRAF-2 a CD40. También se demostró que el eje sCD40L/CD40/TRAF2 induce la activación de Rac1 y p38 MAPK, lo que conduce a la expresión de P-selectina y un cambio en la forma de las plaquetas y permitió una mayor agregación plaquetaria *ex vivo* y la formación de trombos *in vivo* en presencia de dosis subóptimas de agonistas plaquetarios (50). Las plaquetas interactúan con los neutrófilos los cuales son

fundamentales para muchos procesos inflamatorios y recientemente se informó que expresan CD40 (51). sCD40L, que se acumula durante el almacenamiento de componentes sanguíneos, tiene la capacidad de activar los neutrófilos adherentes y causa daño endotelial y posiblemente síndrome TRALI (lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión) en pacientes predispuestos. Las plaquetas activadas liberan sCD40L en la circulación donde puede unirse a CD40 en los neutrófilos. Los neutrófilos se activan y liberan ROS, que puede estimular plaquetas adicionales (52), por lo que el estudio de la interacción de las células del sistema inmune y las plaquetas es esencial para entender la relación de las plaquetas con la inmunotrombosis.

5.3. Células inmunes y su interacción con plaquetas activadas

En la coagulación también se han descrito funciones leucocitarias. En trombosis patológicas, influyen la activación aberrante de la coagulación, alterando la pared de los vasos sanguíneos (53). Se pudieron apreciar más conexiones de las células del sistema inmune y la coagulación con el concepto de inmunotrombosis, entregando más pistas del rol de la formación de trombos macro y microvascular (16). Células del sistema inmune participan en la hemostasia, como los leucocitos, los cuales se añaden a E- y P-selectina del tejido endotelial, generando una señalización “inside out” en la célula inmune, uniéndose a PSGL-1 (Glicoproteína ligando de la P-selectina), induciendo a la fosforilación de Naf 1 por medio de una enzima Src quinasa dependiente, causando la expresión de integrina Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) la cual, por medio de una quimiocina mejora su afinidad a ICAM-1 y en menor medida a JAM-C y RAGE, sus ligando, ubicados en la membrana endotelial, generando una señalización “outside-in” en el neutrófilo, causando una estimulación de, citoquinas y quimioatrayentes proinflamatorios (54, 55). $\alpha_M\beta_2$ o LFA-1 también es una integrina que cumple funciones primordiales en la adhesión de neutrófilos en el endotelio, aumentando la efectividad, la velocidad de la adhesión y contribuyendo al proceso de rodado de la célula

inmune (56), uniéndose a ligandos como ICAM-1 o ICAM-2 (17) como se encuentra en la figura 6.

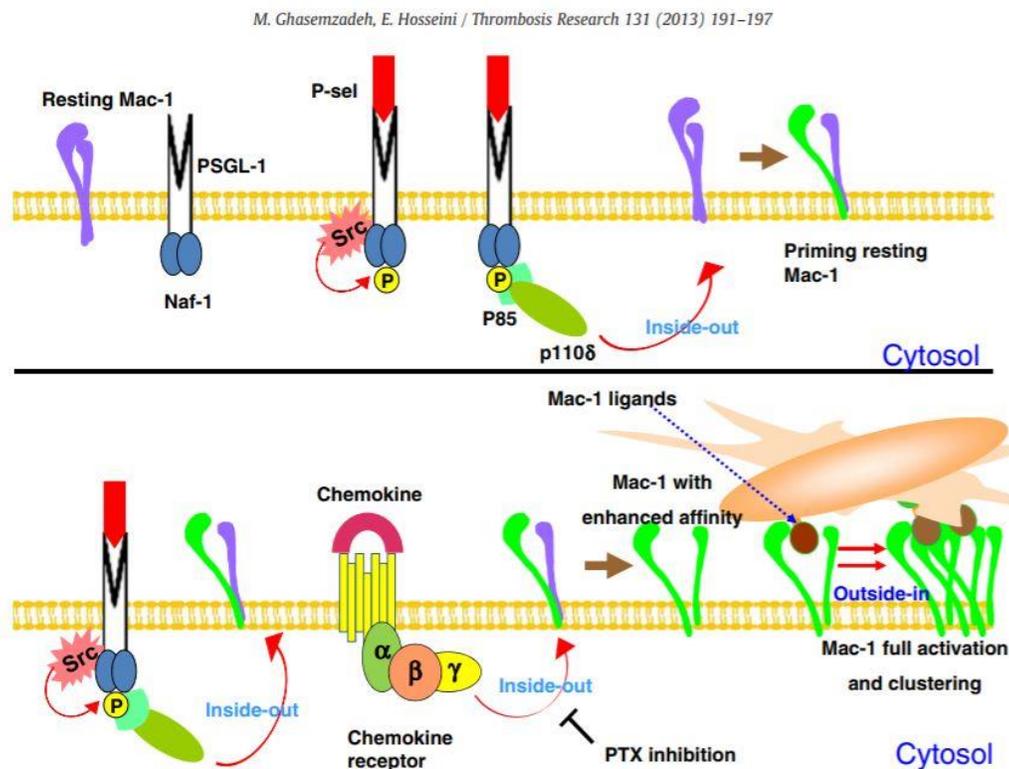


Figura 6. Adhesión de neutrófilos a tejido endotelial por P-selectina. Se observa la adhesión de neutrófilos al tejido endotelial por medio de P-selectina que causa en la célula endotelial un proceso “inside-out”, expresando el receptor cebado Mac-1, el cual por medio de un proceso “inside-out” posterior por medio de receptores de citocinas, Mac-1 aumenta su afinidad hacia su ligando, el cual se encuentra presente en la membrana plasmática del neutrófilo. Tomado de: Ghasemzadeh M. 2013 (54).

Los receptores de quimioquinas son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G (57). Las quimioquinas estimuladas por esta reacción en neutrófilos son esenciales para la adhesión leucocitaria, como la quimiocina CCL5, las cuales deben ser inmovilizadas en el lumen endotelial por medio de glicosaminoglicanos de una plaqueta activada para que ocurra el reclutamiento por medio de receptores como CCR1 y CCR5 (C-C chemokine receptor type 1 o 5) (58). Se encontraron ARNm de CCR1, CCR3 y CXCR1 en plaquetas, y también se mostró CCR1 a nivel de proteína. La activación a través de estos receptores de quimioquinas aumenta, en lugar de iniciar, los procesos inflamatorios, la agregación plaquetaria, la hemostasia y la formación de trombos (59).

Este proceso no solamente ocurre entre el tejido endotelial y los leucocitos, sino que también está presente en la interacción de plaquetas con leucocitos, donde en el momento de la trombosis, las plaquetas se unen a sus ligandos subendoteliales, activando la liberación de gránulos, los cuales contienen citoquinas y P-selectina (en α -gránulos), resultando en una activación leucocitaria (60), donde esta célula del sistema inmune se une por medio de P-selectina a PSGL-1 y estabilizando la adhesión por una unión entre Mac-1 y GPIb (o ICAM-2) en la membrana plaqueta. También se describen otras interacciones, como la conexión de Mac-1 y α IIB β 3 por medio de fibrinógeno (61), como se aprecia en la figura 3. Los leucocitos reclutados pueden reclutar plaquetas activadas circulantes a través de interacciones P-selectina-PSGL-1 y contribuir a una mayor activación plaquetaria a través de la catepsina G y al depósito de fibrina (62).

Los polimorfonucleares también pueden unirse a las plaquetas por este método, generando que la adhesión de las células como los neutrófilos a las plaquetas cause la activación de estas últimas por medio de PSGL-1 (63) vistos en la figura 7.

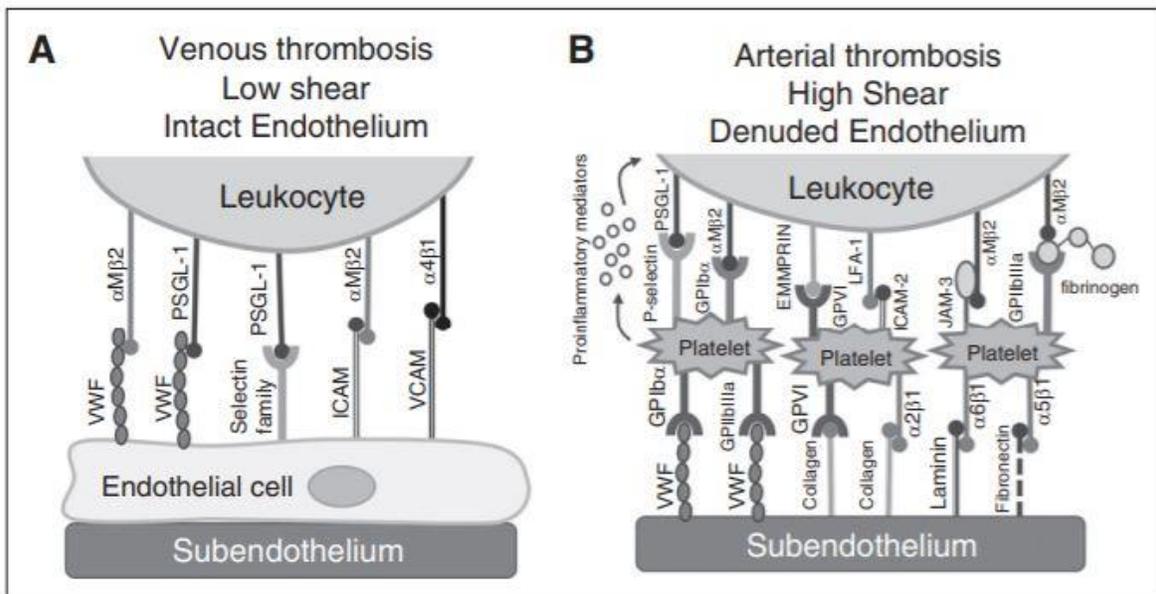


Figura 7. Métodos de adhesión de leucocitos al tejido endotelial. Adhesión de leucocitos en endotelio por trombosis venosa por cizallamiento, donde el endotelio permanece intacto, pero es activado por una presión prolongada en la piel (A). Adhesión de leucocito a plaqueta y sus interacciones en un caso de una trombosis arterial donde el endotelio se ve dañado, exponiendo el subendotelio (B). Tomado de: Swystun LL. 2016 (53)

Esta interacción de leucocitos con plaquetas por medio de P-selectina conlleva a la expresión de factor tisular, mayor expresión de Mac-1 en monocitos para la unión de factor X activado (FXa) y/o fibrinógeno, siendo este agregado leucocito-plaqueta sea procoagulante (53). Los neutrófilos y en menor medida los monocitos y basófilos, pueden liberar enzimas granulares como catepsina G y elastasa, las cuales también promuevan la coagulación, como activando cofactores como factor V, factor XIII y FX. A su vez puede

degradar antitrombina, cofactor de heparina II y/o inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) como lo presenta la figura 8 (53).

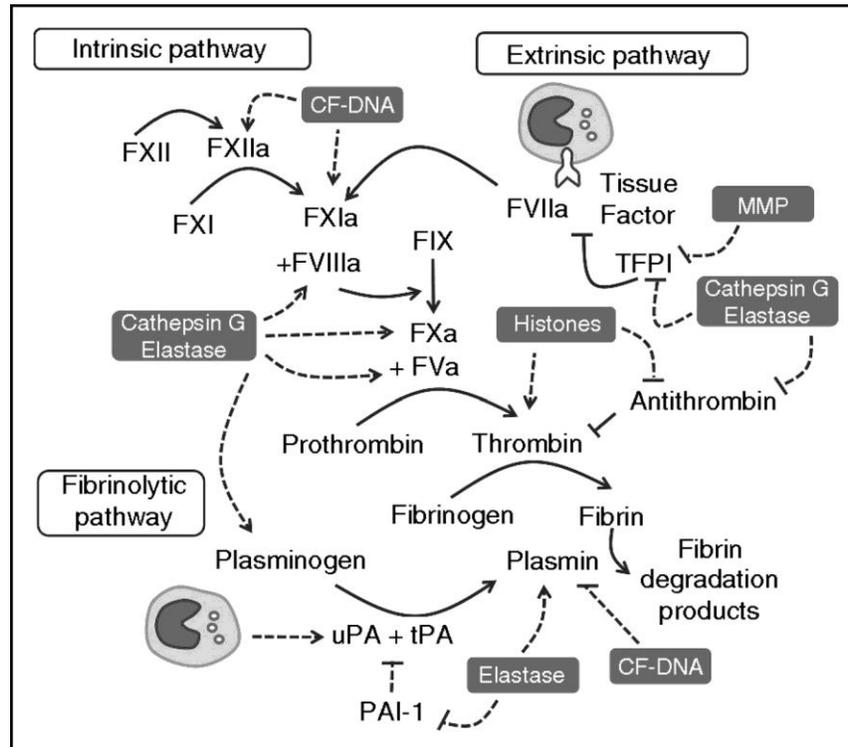


Figura 8. Leucocitos y su interacción en la coagulación. Interacción de leucocitos en las vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación. Se aprecia el efecto de enzimas como la catepsina G y la elastasa, las cuales estimulan la coagulación. Tomado de: Swystun LL. 2016 (53)

La implicación potencial de los PMN en la coagulación se ha estudiado predominantemente en condiciones patológicas o no fisiológicas, donde su funcionalidad

está alterada y se ha demostrado que los trombos contienen una gran cantidad de PMN, sugiriendo una relación de los factores que contribuyen a la trombosis asociada a sus biomateriales (64). Además, la actividad quimiotáctica de la trombina sobre estas células sugiere un reclutamiento activo durante la formación del coágulo (64). Por lo que las propiedades procoagulantes de los PMN están frecuentemente relacionadas con su interacción con las células endoteliales, y los daños causados por los productos derivados de los granulocitos promueven el inicio de la coagulación (64).

Es importante mencionar también la presencia de IL-1R en plaquetas, la cual al ser estimulada con IL-1 β potencia la estimulación de agregación y adhesión inducido por trombina, donde este receptor es activado por medio un ciclo autocrino luego de estímulos inflamatorios y protrombóticos por LPS y trombina, como lo muestra la figura 9 (65). Otro punto que agregar es la relación que presenta IL1R1 con el índice de masa muscular, donde se presenta una mayor expresión del receptor en individuos con mayor IMC ya que al ser la obesidad considerada como un estado de inflamación crónica, aumentan las concentraciones de citoquina en sangre, como IL-1 β (66). Esto facilita la unión IL1R1/IL-1 β , desencadenando la activación de las vías metabólicas de factor nuclear κ B, PI3K/Akt y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) en megacariocito en su proceso de maduración, incrementando en megacariocitos la ploidía y la producción de genes mRNA inflamatorios y trombóticos, que pueden ser transferidos a otras células inmunes o endoteliales, durante una trombosis o una inflamación. (67). IL1 β aumentó la adhesión plaquetaria a diferentes sustratos sola y en combinación con trombina y provocó la formación de agregados heterotípicos. Estas vías también podrían estar involucradas en los efectos de IL1R1 e IL1 β en las plaquetas. IL1R1 promueve la función inflamatoria en las plaquetas, lo que podría aumentar la aterosclerosis y la trombosis (67). Curiosamente, Las transcripciones específicas derivadas de plaquetas inflamatorias, incluidas ICAM1, IFNG, IL1R1, IL6, MPO y TLR2, se asociaron significativamente con un IMC más alto. Se encontró que las transcripciones seleccionadas eran altamente heredables, incluyendo GPIBA y COX1 (68). Casi uniformemente, las transcripciones hereditarias no estaban

asociadas con la obesidad o antecedentes de enfermedad cardíaca. Estos datos mostraron que las transcripciones inflamatorias derivadas de las plaquetas, particularmente aquellas que forman parte de la vía NFκB (68). Este tema de asociar la obesidad con la interacción de las plaquetas con el sistema inmune será desarrollado más adelante en este documento.

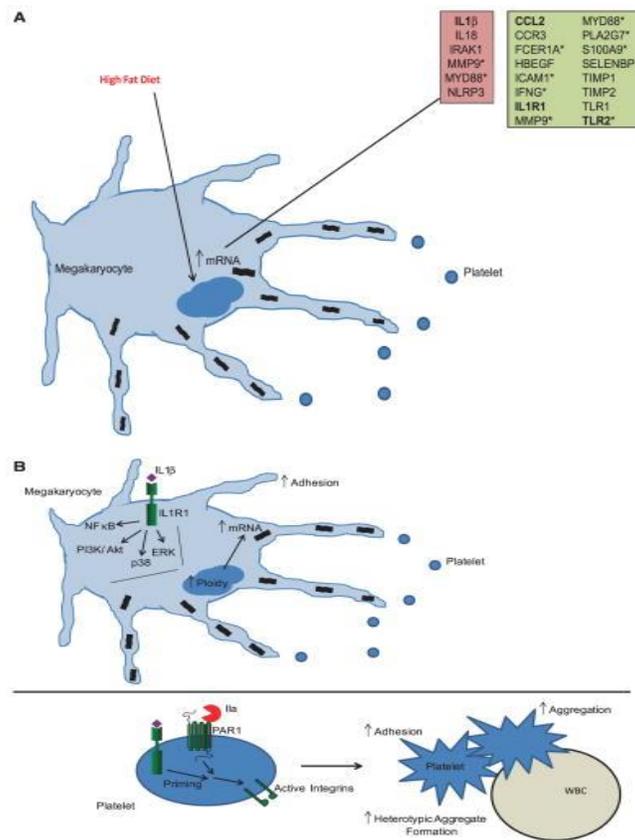


Figura 9. Efecto de la interacción IL1R1/IL-1β en plaquetas. Efecto de la interacción IL1R1/IL-1β, donde en (A) se presenta un caso de una persona con una dieta alta en grasas, generando genes inflamatorios y trombóticos. (B) representa un caso donde se presenta IL-1β circulante e interaccionando con el receptor IL1R1, generando una activación de diversas cascadas de señalización, concluyendo en la formación de genes mRNA inflamatorios y trombóticos. Por último, se muestra el efecto de la interacción IL1R1/IL-1β en plaqueta. Tomado de: Beaulieu LM et. al. 2014 (67).

Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas por células con el fin de generar un efecto específico en otra célula, generando una posterior comunicación (33). La mayoría de las integrinas requieren activación para la unión del ligando. Por lo que las plaquetas expresan las integrinas α IIb β 3 (GPIIb/IIIa), α 5 β 1, α 6 β 1, α 2 β 1 y α v β 3. La activación y presentación del sitio de unión del ligando de α IIb β 3 se inicia colocando el dominio de la cabeza de la molécula de talina intracelular entre las cadenas alfa y beta (62). Esto provoca un cambio de conformación en los dominios extracelulares, seguido de la unión del ligando, lo que provoca una señalización adicional que madura el enlace. Las integrinas pueden amplificar su capacidad de unión formando grupos y parches en la superficie celular (62). A través de los α -gránulos, las plaquetas tienen la capacidad de liberar diferentes tipos de citoquinas como IL-1 β e IL-6, siendo estas esenciales para estimular a las células inflamatorias por quimiotaxis (32). Por medio de los α -gránulos las plaquetas otros tipos de citoquinas como CXCL4, NAP-2 y ligandos de CXCR 1/2 los cuales ayudan a la activación de monocitos, adhesión de neutrófilos, reclutamiento de células inmunes y cambiar el gradiente quimiotáctico dentro de un trombo, facilitando la migración leucocitaria hacia una herida en el endotelio (69).

AKT es una serina/treonina quinasa que participa en procesos celulares esenciales como la supervivencia, proliferación y metabolismo celular (70). AKT2 juega un papel fundamental en la regulación de la adhesión estable y el rastreo de neutrófilos y las interacciones heterotípicas de neutrófilos y plaquetas durante la inflamación de venas inducida por TNF- α . Dichos efectos reguladores resultaron del control de la expresión superficial de la integrina Mac-1, la interacción β 2-talin1, y movilización de iones calcio intracelular durante la activación de los neutrófilos (71).

Las plaquetas median el reclutamiento de leucocitos a través de dos mecanismos principales: (a) sirviendo como sitio de acoplamiento para las células inmunitarias a lo

largo del endotelio que rodea el foco inflamatorio y (b) a través de la secreción de quimioatrayentes (1). Las plaquetas son esenciales para la extravasación de neutrófilos a los sitios inflamatorios, pero esto depende de la ubicación específica del tejido. Mostramos que las plaquetas son esenciales para la infiltración de neutrófilos en el peritoneo, la piel y el cerebro (72). Las plaquetas estimulan directamente la producción de NET a través del proceso de NETosis. A su vez, los NET amplifican la activación plaquetaria, la agregación y la activación de la trombina, y los tres actúan en sinergia para promover la coagulación intravascular en la sepsis (1).

5.5. Formación de NETs

Con la finalidad de eliminar patógenos en el organismo, una de las funciones que presentan los neutrófilos, es la formación de trampas extracelulares conocidas como NETs, estructuras compuestas por gránulos y constituyentes nucleares que desarman y matan bacterias extracelularmente (73). Por medio de trampas similares a redes formadas por cromatina descondensada y envueltas en peptidasas citotóxicas (74), cumplen un rol vital en la inmunidad innata, recurriendo a este método con el fin de combatir patógenos demasiado grandes para ser fagocitados (75). Este proceso puede ser inducido por diversas condiciones patológicas o *in vitro*, por estímulos como acetato de miristato de forbol (PMA), LPS o puede manifestarse en casos de sepsis, uniéndose a plaquetas, glóbulos rojos o proteínas plasmáticas (76).

Dentro de las características estructurales de las NETs se encuentran tramos suaves con un diámetro de 15 a 17 nm y dominios globulares con un diámetro de 25 a 50 nm como se aprecia en la figura 10 (77), constituido principalmente por neutrófilo elastasa, ADN y

proteínas histonas con un complejo H2A-H2B-ADN, en donde contienen gránulos primarios, secundarios y terciarios (73), .

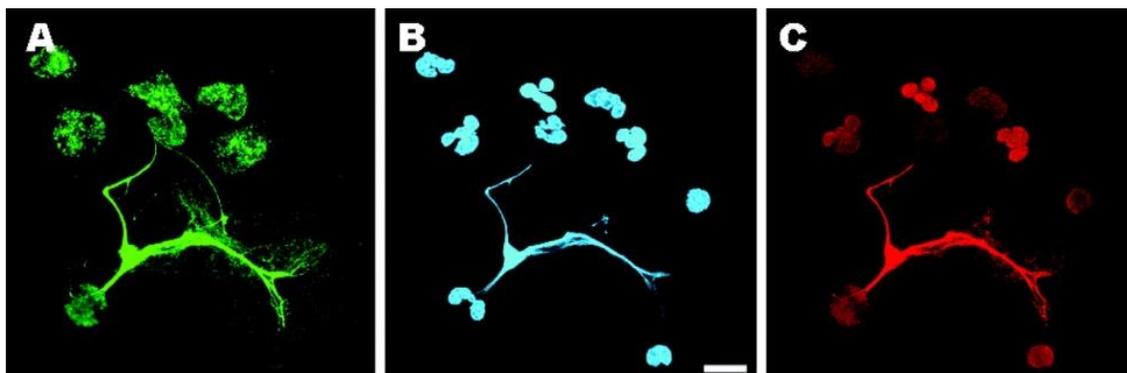


Figura 10. Estructura de NETs activadas por IL-8. Inmunotinción de NETs por medio de activación por 30 minutos con IL-8, pudiendo observar neutrófilo elastasa (A), ADN (B) y el complejo H2A-H2B-ADN (C). Tomado de: Brinkmann V et. al. 2004 (73)

Existen distintas vías para la formación de NETs, dependiendo del estímulo y si el neutrófilo sobrevive al proceso o no. Uno de estos métodos es estimulado PMA, ionóforos, nigericina y patógenos como *Candida albicans* y GBS, causando la activación proteolítica de los neutrófilos, generando compuestos por ADN cromosómico resultando en la muerte del neutrófilo al momento de generar las NETs (78), este proceso es conocido como NETosis. En esta vía la célula inmune manifiesta cambios morfológicos secuenciados de la siguiente manera; donde a causa del estímulo se generan cambios en la cromatina y la pérdida de la forma lobular del núcleo, seguido de la separación de la membrana nuclear y granular, permitiendo la mezcla de componentes nucleares, citoplasmáticos y granulares y al momento de finalizado se rompe la membrana celular, permitiendo la liberación del NET

(78). Por otro lado, se han descrito ocasiones en una etapa temprana de infección de *Staphylococcus aureus* (primeros 10 minutos) donde se forman NETs por un proceso similar, rompiendo la membrana nuclear para mezclar sustancias del citoplasma con el ADN, pero posteriormente son encapsuladas en vesículas para ser liberadas al medio extracelular, sin causar la muerte del neutrófilo (79) como se observa en la figura 11.

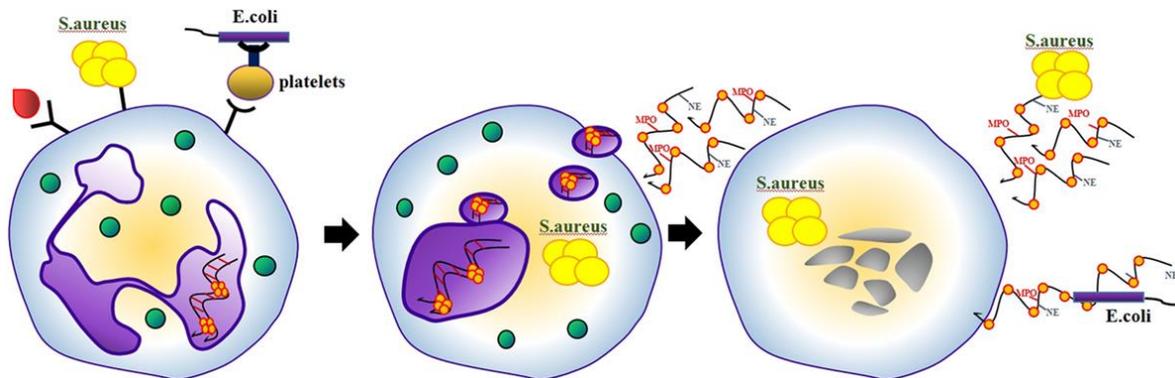


Figura 11. Estímulos inductores de NETosis en las plaquetas. En estas condiciones, los neutrófilos liberan NET a través de la formación de ampollas en la envoltura nuclear y la exportación vesicular. Como resultado, los neutrófilos se convierten en citoplastos nucleares, que aún pueden migrar y retener varias funciones convencionales de neutrófilos viables. Tomada de: Yang H. et.al. 2016 (80)

Para ambas vías de formación de NETosis se debe tener en cuenta que debido a su estímulo pueden ser independiente de NADPH oxidasa, ya que para la formación de NETs no se produjeron especies reactivas de oxígeno (ERO) (78) y la vía que depende de la enzima NADPH oxidasa, en donde se generan cambios morfológicos debido a la alta producción de oxidantes en el neutrófilo (79), como lo explica de forma resumida la tabla

2. Los ERO producidos en esta última manera, activan la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4) la cual citruliniza y desmetiliza histonas, específicamente H3 y H4 (81) para la unión con H1 y proteína de heterocromatina 1 β , todo estos procesos son efectuados sin la presencia de caspasa 3 clivada o fosfatidil-serina (82). El mecanismo de producción de NETs dentro del neutrófilo es aún desconocido, pero últimamente algunos estudios dan indicios de algunas vías, siendo la más conocida la iniciado por la unión del ligando a los receptores tipo toll de neutrófilos y los receptores para IgG-Fc, complemento o citocinas (73). Tras la activación de estos receptores, los depósitos de calcio del retículo endoplásmico liberan iones de calcio en el citoplasma. Los niveles elevados de calcio citoplasmático aumentan la actividad de la proteína quinasa C (PKC) y la fosforilación de gp91phox, lo cual induce el ensamblaje de las subunidades citosólicas y unidas a la membrana de la NADPH oxidasa en complejos funcionales en las membranas citoplásmicas o fagosomales (también llamados oxidasa fagocítica, PHOX) y la generación subsiguiente de ERO (80). Otro método que aún está estudiándose es aquel en donde la NETosis suicida implica la cascada de señalización dependiente de RIPK1, RIPK3 y MLKL de la producción intracelular de ERO (83). El reclutamiento de MLKL por RIP3 conduce a la fosforilación de MLKL y tetramerización de MLKL. Los MLKL tetramerizados se trasladan a balsas lipídicas de la membrana plasmática por un mecanismo desconocido, pero se requieren ciertas características estructurales en el área entre la primera y la segunda hélice α de MLKL (84). El complejo MLKL en la membrana plasmática es capaz, ya sea por sí mismo o a través de otra(s) proteína(s) de membrana, de aumentar la entrada de sodio. La mayor concentración de sodio intracelular aumenta la presión osmótica, lo que conduce a la entrada de agua y, en última instancia, a la inflamación de las células y la ruptura de la membrana plasmática (84).

Tabla 2. Comparación de los tipos de formación de NETs. Tomada y adaptada de Li T. et.al. 2020 (76)

Tipo	Proceso principal	Estado de supervivencia del neutrófilo	Tiempo
Mediado por vesículas	Ruptura de la envoltura nuclear y formación de vesículas	Viva	5-60 minutos
Lisis celular	Citrulinación de histonas y ruptura de la membrana celular	Muerta	180-240 minutos

5.6 Plaquetas activadas y formación de NETs.

La formación de NETs a causa de plaquetas activadas se ha visto en distintos casos, uno de estos es en casos de sepsis, donde en ratones con una alta bacteriemia, las plaquetas fueron capaces de activarse, por medio de altas concentraciones de LPS, uniéndose por receptores TLR4 a neutrófilos, activando estas células inmunes y desencadenando la formación de NETs (85). Cabe destacar que el neutrófilo solamente con LPS no es capaz de inducir la formación de NETs, atrapando bacterias en circulación. Esto se presenta solo en circunstancias de una de infecciones sistémicas graves, presentándose en vasos pequeños, llevando a un consecuente daño endotelial y de tejido (85). Este efecto también pudo apreciarse con plaquetas previamente activadas con Pam3CSK4, un agonista de TLR1/TLR2 con una estructura similar a los principales componentes de la capa lipopeptídica de las bacterias Gram positivas, por lo que la formación de NETs puede ocasionarse en caso de infecciones con bacterias Gram positivo y Gram negativos (86). Sin

embargo, como las NETs son liberadas a circulación, este puede depositarse en órganos, causando efectos proinflamatorios que pueden llegar a una falla del órgano (80).

La formación de NETs por medio de plaquetas activadas en sepsis es mediada por la síntesis y/o producción de VWF, factor plaquetario 4 (PF4) y TXA₂ en plaquetas activadas por LPS (87). Incluso también se describe en la literatura que la GPIb, la cual clásicamente se une a VWF es requerido para la formación de NETosis (88), donde la unión de GPIb y VWF causa una señalización intraplaquetaria que lleva a la activación de GPIIb/IIIa, la cual posteriormente se une al neutrófilo por medio de una proteína de membrana conocida como SLC44A2, activando la vía NADPH oxidasa dependiente de la NETosis como lo explica la figura 12.

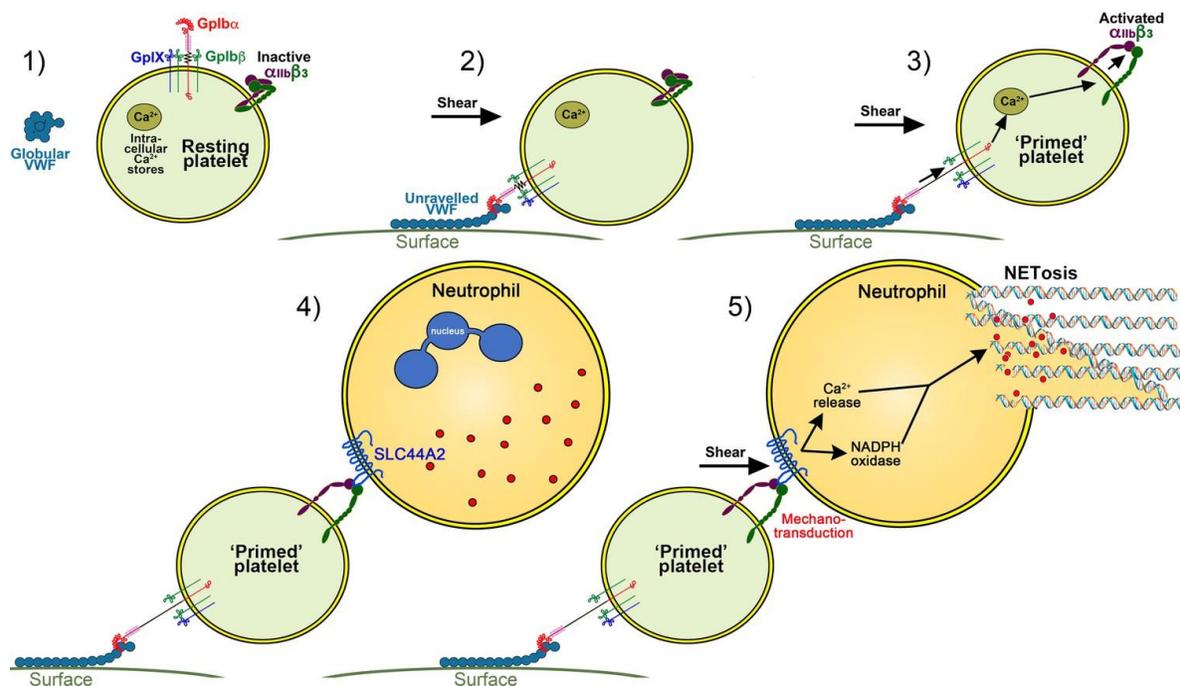


Figura 12. Activación plaquetaria, unión a neutrófilo y NETosis. (1) Se aprecia una plaqueta en condiciones normales con VWF circulando como gránulos en circulación en condiciones normales. (2) Al momento de la unión de VWF a una superficie celular, este expone su dominio A1 en donde se une la GPIb. (3) La unión de la plaqueta con VWF radica en una cascada de señalización que lleva a la activación de GPIIb/IIIa. (4) La unión de GPIIb/IIIa al neutrófilo por medio de la proteína SLC44A2. (5) La unión con la plaqueta genera una cadena de señalización que induce a la NETosis. Tomada de: Constantinescu-Bercu A. 2020 (89)

En otro aspecto en donde se puede apreciar la influencia de NETs y se relaciona con las plaquetas es en casos de la trombosis. Debido a que las NETs circulan en el tejido, estas pueden activar plaquetas y facilitar el reclutamiento plaquetario por medio de uniones entre histonas y TLR2/TLR4, lo cual lleva a la consecuencia de la formación de trombos (90), observándose NETs en trombos y plasma con trombosis profunda venosa (DVT en inglés), revelando la importancia estructural que presentan las NETs en los trombos (91), además la neutrófilo elastasa es una serino proteasa con funciones de inactivar la vía de inactivación del factor tisular, aumentando la coagulación *in vivo* (91). Por último, también se tiene que tener en cuenta que las histonas pueden inducir directamente la muerte de las células epiteliales y endoteliales y pueden mediar en la trombosis *in vivo* (80).

Fuchs et al. demostraron que por medio de la perfusión de NET con plaquetas suspendidas en plasma y observamos NET 3D con plaquetas ávidamente adheridas como se observa en la figura 13, observando de las micrografías electrónicas una acumulación de plaquetas activas en una malla fibrosa de NET por la presencia de filópodos (92). La perfusión de NET con sangre anticoagulada a velocidades de cizallamiento altas (900/s) o velocidades de cizallamiento típicamente venosas bajas (200/s) dieron como resultado una agregación plaquetaria dependiente del tiempo que se movían en tres dimensiones (92). Dentro de 1 minuto desde el inicio de la perfusión, aparecieron pequeños agregados de

plaquetas en los NET, mostrando que las áreas cubiertas por NET eran constantes, mientras que las plaquetas se adhirieron y agregaron de manera dependiente del tiempo (92). Cuando la sangre se complementó con ADNasa al comienzo de la perfusión, los NET se degradaron rápidamente y no se formaron agregados de plaquetas (92).

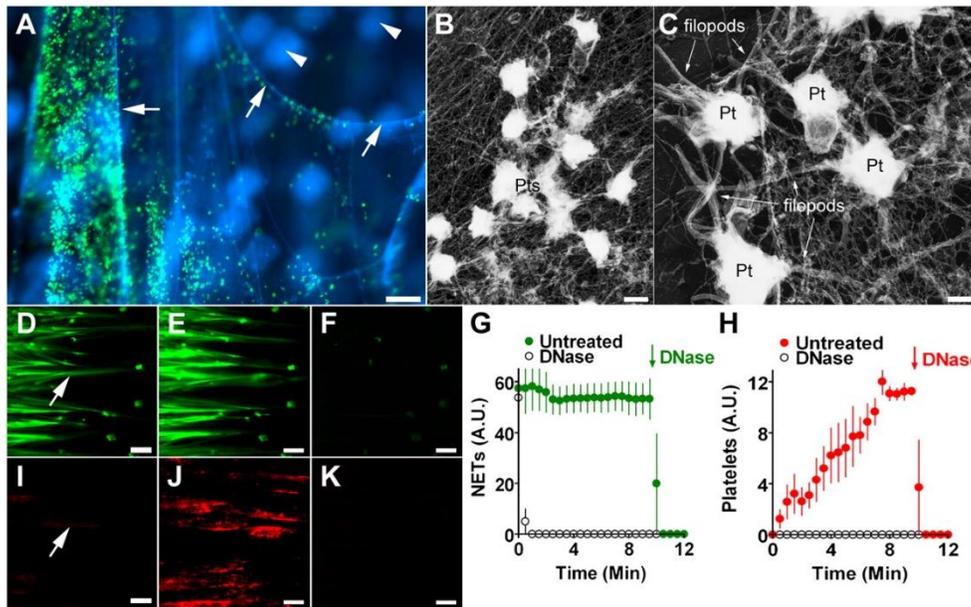


Figura 13. Adhesión de plaquetas en plasma perfundido con NETs. Plaquetas unidas a NETs (A), Micrografía electrónica de plaquetas adheridas a una malla fibrosa de NETs (B), Numerosos filopodos indicaron que las plaquetas en NET estaban activadas (C). Los NET (D y E, verdes) se perfundieron con plaquetas (I y J, rojas) en sangre total. La dirección del flujo fue de izquierda a derecha. Las imágenes mostraron NET y plaquetas después de 1 min (flechas en D e I) y 10 min (E, J) de perfusión. La ADNasa añadida a la sangre después de 10 min digirió los NET (F) y eliminó las plaquetas (K), lo que indica que las plaquetas estaban unidas a los NET. Cuantificación de NET (G) o plaquetas (H) en presencia (círculos abiertos) o ausencia de DNasa (círculos cerrados). Se añadió ADNasa a las muestras no tratadas después de 10 min (flecha) Tomada de: Fuchs, T. A. 2010 (92).

Recientemente se demostró que los neutrófilos y los NET están involucrados en la patogenia de la diabetes mellitus tipo 1 donde al intentar correlacionar la NETosis con la muerte de las células β en la diabetes tipo 1 (93) donde los niveles de proteína circulante y las actividades enzimáticas de la proteinasa 3 (PR3) y la elastasa de neutrófilos (NE) estaban significativamente elevados en pacientes con diabetes tipo 1, especialmente en pacientes con una duración de la enfermedad de menos de 1 año, en comparación con sujetos de control de la misma edad y género (93). Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que el aumento en los niveles circulantes de proteína NE y PR3 puede estar asociado con una mayor formación de trampas extracelulares de neutrófilos (94). En un estudio a pacientes con diabetes tipo 2 también se demostró un aumento de los productos de NETosis concluyendo que la glucosa alta *in vitro* y la hiperglucemia *in vivo* inducen NETosis y la liberación de NET y sus productos (95), comparando niveles de elastasa de neutrófilos, mono y oligonucleosomas y ADN de doble cadena libre de células (dsDNA) con los sujetos de control, observándose una correlación positiva entre HbA1c y mono y oligonucleosomas. Además, la concentración sérica de IL-6 y TNF α , que también se sabe que son inductores de NET, se demostró que estaban elevados en pacientes con diabetes tipo 2 (96) Debido a la fisiopatología de la diabetes tipo 2, estos son más propensos a infecciones graves por lo que los neutrófilos diabéticos puedan mostrar una NETosis constitutivamente hiperactiva, pero que no respondan adecuadamente a los estímulos químicos y a la infección mediante la liberación de NET (96).

5.7. Interacciones en trombosis

5.7.1. Tromboinflamación

Aproximadamente el 80% de todos los accidentes cerebrovasculares son causados por isquemia cerebral, siendo la mayoría de los accidentes cerebrovasculares isquémicos no

lacunares de origen tromboembólico y las fuentes comunes de embolia son las enfermedades cardíacas, en particular la fibrilación auricular, así como la aterosclerosis extracraneal sintomática de las grandes arterias (97). Aunque no exista un consenso del significado exacto de la palabra, podemos decir que se usa el concepto de tromboinflamación para describir la función plaquetaria en inflamación posterior a una lesión (98) también puede definirse como se referirá a las respuestas patológicas dentro de la vasculatura después de la lesión de los vasos sanguíneos, la invasión de una variedad de patógenos o desencadenantes inflamatorios no infecciosos, considerando la formación de trombos, la activación del sistema de coagulación, la inmunidad innata y adaptativa como un proceso perjudicial integrado. (99). La característica común en la enfermedad tromboinflamatoria es la interacción del endotelio y los sistemas inmunológico y hemostático. En estas enfermedades, la inflamación desencadena la trombosis, que a su vez alimenta la respuesta inflamatoria. En la trombosis se observa un aumento de las interacciones plaquetas-leucocitos en el endotelio inflamado, en los trombos y en la sangre (100).

Las plaquetas, luego de un traumatismo, pueden unirse a la matriz extracelular, anclándose y rodando sobre la pared del vaso dañado, resultando en una adhesión firme (101), esta adhesión de las plaquetas a las células endoteliales también puede apreciarse cuando no se presenta un daño, agregándose cuando las plaquetas o las células endoteliales fueron activadas con agentes como trombina o ADP u otras citoquinas (102), encontrándose también en arteriolas con lesiones isquémicas o por perfusión se pueden encontrar moléculas inflamatorias como P-selectina o la presencia de leucocitos de adhesión dependientes de integrina $\beta 2$ (103). En los lugares donde el endotelio se encuentra activado, las plaquetas poseen la capacidad de unirse a leucocitos por medios descritos anteriormente, por receptores-ligando de P-selectina-PSGL-1, GPIb-Mac-1, GPIIb/IIIa-Mac-1 por fibrinógeno y CD40-CD40L (104). Es importante destacar la unión de P-selectina a PSGL-1, puesto que esta media el reclutamiento de los leucocitos, induciendo la activación de integrinas y aumentando la adhesión de leucocitos al endotelio (105) como

también la relevancia de GPIb-Mac-1, la cual se ha confirmado que promueve la adhesión entre las plaquetas y los leucocitos, donde Giles et al. Administrando anticuerpos anti-GPIb α en contexto de inflamación cerebral inducido por LPS, mostrando una disminución de un 44% en el número de neutrófilos en el tejido cerebral luego de haber sido inducida la inflamación con LPS, mostrando que la invasión de neutrófilos medida por plaquetas al cerebro depende de GPIb α (106).

Conociendo el mecanismo principal por el cual la interacción entre plaquetas y las células inmunes afectan en el tejido cerebral, podemos resumir la información en una única figura diseñada por Rawish, E et al. Para tener una mejor visión del mecanismo de tromboinflamación en accidentes cerebrovasculares en la figura 14.

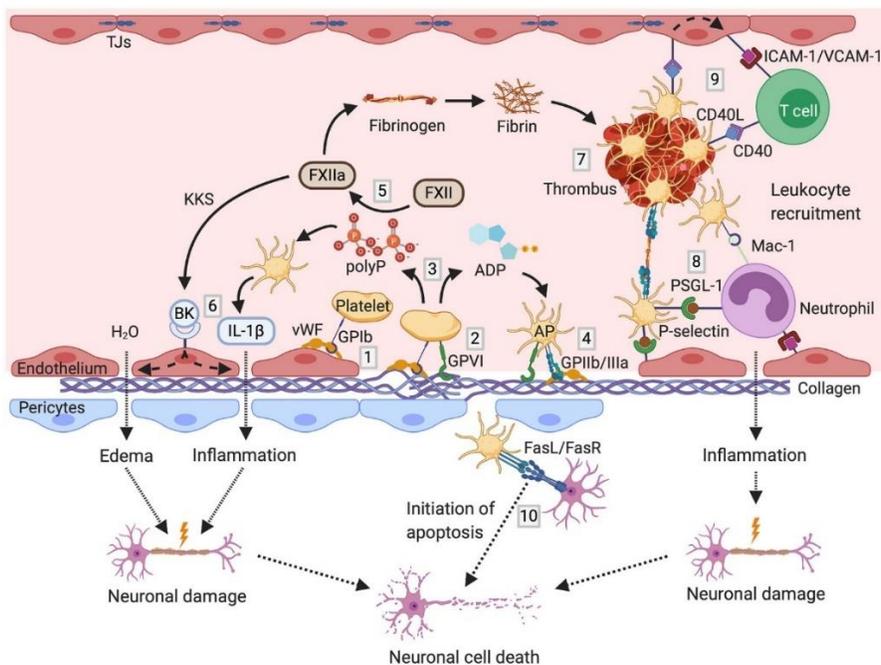


Figura 14. Mecanismo de tromboinflamación en accidentes cerebrovasculares. El anclaje inicial de las plaquetas a la matriz extracelular o al endotelio en el sitio de la lesión vascular isquémica está mediado por la unión de GPIb al vWF expuesto (1). La interacción entre el receptor plaquetario GPVI y el colágeno subendotelial desencadena la activación plaquetaria (2). Las plaquetas activadas liberan factores paracrinos, incluidos ADP y polyP (3), lo cual promueve la regulación positiva funcional de GPIIb-IIIa (4). Los polyP cargados negativamente activan la coagulación FXII (5). FXIIa estimula la activación del KKS, promoviendo así la liberación del péptido proinflamatorio bradicinina y otras citoquinas como IL-1 β (6). FXIIa inicia la vía de coagulación intrínseca, desencadenando la formación de trombos por engendramiento de fibrina (7). Las plaquetas activadas median la tromboinflamación mediante el reclutamiento de leucocitos a través de la unión de plaquetas P-selectina al leucocito PSGL-1 así como a través de la interacción GPIb-Mac-1 (8). La unión estable de los leucocitos a la pared del vaso se logra mediante la interacción entre el CD40L plaquetario y el CD40 en las células endoteliales, lo que promueve la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales (9). Las plaquetas en la infiltración de células inmunitarias en el parénquima cerebral, lo que conduce a un mayor daño neuronal. Además, las plaquetas pueden iniciar la apoptosis a través de la expresión del receptor de muerte FasL en su superficie (10) Tomada de: Rawish, E. 2020 (107).

5.7.2. Tromboembolismo venoso

La trombosis venosa profunda (TVP) y la embolia pulmonar, denominadas colectivamente tromboembolismo venoso, constituyen una importante carga mundial de morbilidad con una carga mundial importante con alrededor de 10 millones de casos cada año, lo que representa la tercera enfermedad vascular después del infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular, aumentando en los últimos años debido al envejecimiento de la población, una mayor prevalencia de comorbilidades asociadas con el

tromboembolismo venoso, como la obesidad, la insuficiencia cardíaca y el cáncer, y la mejora de la sensibilidad y el uso generalizado de pruebas de imagen para detectar el tromboembolismo venoso (108).

La TVP puede desencadenarse por alteraciones en el flujo sanguíneo venoso, activación o disfunción del endotelio vascular e hipercoagulabilidad. La inmovilización por un vuelo de larga distancia, la posición postrada en la cama también pueden provocar alteraciones del flujo y estancamiento del flujo sanguíneo en las venas que conducen a la TVP (109). El desarrollo de trombos venosos en humanos a menudo comienza en el seno de la válvula donde, debido a la compleja mecánica de fluidos en los bolsillos de la válvula, el patrón de flujo sanguíneo se vuelve anormal y conduce a una disfunción endotelial (110).

Se ha demostrado en ratones que los trombos venosos contienen grandes cantidades de histona citrulinada extracelular H3 (CitH3), a menudo en las proximidades del VWF, una molécula importante en el inicio de la TVP. También demostramos que las histonas administradas por vía intravenosa exacerban la TVP, mientras que la DNasa-1, que degrada los NET, protege a los ratones de la trombosis venosa (92). Así como ADN extracelular en áreas ricas en H3Cit. La composición del trombo no difirió entre los pacientes con EP y TVP. Por lo tanto, los NET parecen formarse como parte de la respuesta inflamatoria y la organización en el desarrollo de trombos humanos.

Se propuso que HMGB1 desempeñara un papel importante en la NETosis durante el infarto de miocardio, incluso, HMGB1 purificado solo puede inducir el atrapamiento extracelular de neutrófilos (111). En las plaquetas activadas, HMGB1 se transloca a la superficie de las plaquetas y al entorno extracelular, siendo reconocido por el neutrófilo, el

cual escapa de la apoptosis y los prepara para la generación de NET (111). Este proceso en el miocardio requiere RAGE por lo que la activación por parte de HMGB1 procede a través de diferentes receptores a partir de la activación por LPS o por agonistas de los receptores de péptidos de formilo y tiene distintos resultados funcionales (111).

El proceso de infiltración de leucocitos y reclutamiento de monocitos durante la formación de trombos y el impacto de los NET han recibido atención previa en la TVP experimental (112). Este estudio muestra evidencia de NETosis en curso en la etapa de organización del desarrollo del trombo humano, que incluye H3Cit tanto intracelular como extracelular estrechamente asociado con MPO, Los NET parecen formarse como parte de la respuesta inflamatoria y la organización en el desarrollo de trombos humanos (113). Esto puede observarse en el estudio realizado por Brill A. et al. en 2011, realizó una tinción inmunofluorescente para VWF en trombos venosos en la vena cava inferior en ratas, se observó una presencia CitH3 en la parte roja de los trombos como una tinción puntiforme (intracelular) o difusa (extracelular), como se observa en la figura 15. La tinción inmunofluorescente en el núcleo de la parte roja de los trombos también reveló múltiples células positivas para CitH3. Por lo tanto, es probable que las histonas presentes en los trombos de la VCI murina se originen a partir de neutrófilos que liberan NET predominantemente en la parte roja de los trombos (112).

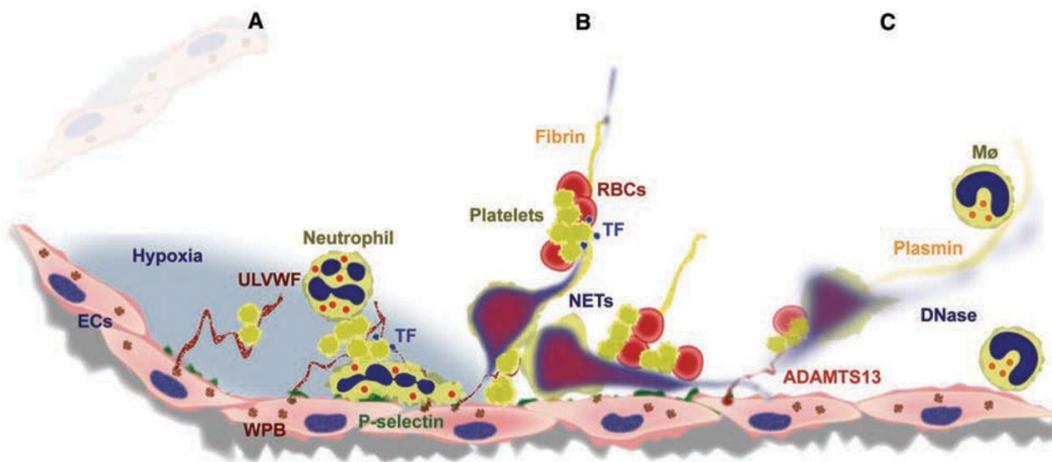


Figura 15. Formación de NETs en TVP. La TVP se inicia por la hipoxia local y la activación de las células endoteliales como resultado de la restricción/perturbaciones del flujo. El endotelio activado libera factor de von Willebrand ultragrande (ULVWF) y P-selectina desde los cuerpos de Weiber-Palade (WPB) que median la adhesión de plaquetas y neutrófilos. Las plaquetas activadas reclutan micropartículas que contienen TF que mejoran la generación de trombina en el trombo en crecimiento (A). Las plaquetas activadas y el endotelio u otro estímulo inducen la formación de NET en los neutrófilos adherentes que proporcionan un andamiaje adicional para la adhesión de plaquetas y glóbulos rojos, promueven la formación de fibrina y exacerban la activación plaquetaria y endotelial (B). La plasmina, una desintegrina y metaloproteinasa con un motivo de trombospondina tipo 1, miembro 13 (ADAMTS13), y DNasa median la trombólisis al degradar la fibrina, ULVWF, y ADN, respectivamente (C). Tomada de: Fuchs, TA . 2012 (92)

5.7. Aterosclerosis y trombosis

Las plaquetas cumplen una amplia variedad de funciones, cumpliendo roles en procesos de hemostasis, retracción de coágulos, constricción celular, reparación e inflamación (23), sin embargo la activación plaquetaria puede causar daño o erosión de placas ateroscleróticas, estimulando la formación de trombos, generando en consecuencia enfermedades de suma gravedad (114).

Los macrófagos y las células del músculo liso dentro de las placas ateroscleróticas también sobreexpresan el potente factor tisular procoagulante. Esta primera asociación aumenta la expresión de Mac-1 en la superficie de los monocitos, apoyando aún más sus interacciones con el receptor plaquetario GPIb, gracias a su dominio I, que es homólogo al dominio vWF A1 y JAM-C (115). Las plaquetas y los monocitos también entran en contacto a través de las interacciones del ligando CD40 del mediador inflamatorio (CD40L) como un activador de la expresión del factor tisular relevante para la enfermedad por parte de los macrófagos humanos (116). La IL-1 β y el ligando CD40 (CD40L, CD154) son citoquinas proinflamatorias importantes. La IL-1 β se sintetiza y libera después de la activación plaquetaria y se ha convertido en un objetivo para el tratamiento de enfermedades coronarias. Interleucina activada sintetizada por plaquetas (IL)-1 β puede inducir la respuesta inflamatoria de las CE y promover la adhesión de las plaquetas a los leucocitos bajo el efecto sinérgico de la e-selectina, la ICAM-1 y las quimiocinas (117), siendo estas últimas capaces de mejorar la fagocitosis de los monocitos y desencadenar ráfagas respiratorias a través de la activación de la fosfoinositol-3-quinasa PI3K, Syk y p38 MAP quinasa (118). También se observó que las plaquetas activadas estimulan la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y la expresión de superficie de ICAM-1 en las células endoteliales mediante la activación de la vía NF- κ B, provocando indirectamente el reclutamiento de monocitos haciendo que la adhesión de las plaquetas al endotelio y las quimiocinas secretadas por las plaquetas contribuyen en gran medida a la posterior adhesión de los monocitos a la pared vascular (119). Las plaquetas apoyan la migración y activación de monocitos, células dendríticas y neutrófilos a través de la

liberación de mediadores inflamatorios solubles como CCL5 y PF4, lo que contribuye a la progresión de la aterosclerosis (120).

6. Conclusiones

A través de esta memoria se puede apreciar el amplio y complejo que son las plaquetas, a pesar de ser porciones de membrana sin núcleo, estas presentan una extensa variedad de funciones en el organismo, no solo para la hemostasis, función más asociadas a ellas, sino que también presentan funciones inmunes, formando complejos mecanismos de inmunidad con células como macrófagos y neutrófilos por medio de interacciones ligando receptor como P-selectina, Mac-1, GPIb, α IIb β 3, formando un agregado plaquetario capaz no solo de formar un coagulo estable, sino que también con la capacidad del reclutamiento inmune por medio de leucocitos y polimorfonucleares a la zona afectada, teniendo la capacidad de reclutar a más células del sistema inmune por medio de la activación de macrófagos y neutrófilos y estos a su vez a las plaquetas, causando una retroalimentación positiva dañina para el organismo. Todo en esto en condiciones fisiológicas, ya que al momento de generarse problemas en donde las plaquetas se activan con una hemostasis normal, puede llevar a graves enfermedades, encontrándose con una trombosis a causa de sedentarismo, obesidad o cáncer. Esto viéndose en casos de tromboinflamación y trombosis venosa profunda, donde conocer la formación de NETs y no en presencia de una sepsis, en donde este ocurre normalmente. Estas NETs pueden activar plaquetas, aumentando aún más el reclutamiento tanto de plaquetas como leucocitos. Por otro lado, estas últimas pueden causar enfermedades de mayor gravedad, como trombosis venosas profundas que pueden afectar al miocardio o formar placas ateroscleróticas, ocasionando trombosis que podría llevar a la muerte.

Por esto es fundamental poder definir de una forma exacta como ocurren estas interacciones entre plaquetas y células inmunes, por medio de glicoproteínas, integrinas, receptores de membrana, en ambos tipos celulares para reconocer los mecanismos en común, explicando las vías metabólicas por las cuales se activan, para finalmente poder prevenir por medio del nuevo conocimiento una desgracia como es perder una vida.

7. Bibliografía

1. Zucoloto AZ, Jenne CN. Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019;6:8.
2. Schrottmaier WC, Mussbacher M, Salzman M, Assinger A. Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis*. 2020;307:109-20.
3. Pircher J, Engelmann B, Massberg S, Schulz C. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2019;119(8):1274-82.
4. Xu XR, Yousef GM, Ni HY. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. *Blood*. 2018;131(16):1777-89.
5. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pao CRR, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*. 2020;136(11):1330-41.
6. Furie B, Furie BC. Mechanisms of disease: Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(9):938-49.
7. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3355-62.
8. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(s1):12-7.
9. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(2):307-26.
10. Cruz MA, Diacovo TG, Emsley J, Liddington R, Handin RI. Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von Willebrand factor A1 domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(25):19098-105.
11. Du X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Current Opinion in Hematology*. 2007;14(3).
12. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003;35(8):1170-4.

13. Amelirad A, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Sarvar DP. Signaling Pathways of Receptors Involved in Platelet Activation and Shedding of These Receptors in Stored Platelets. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019;9(1):38-47.
14. Thijs T, Nuyttens BP, Deckmyn H, Broos K. Platelet physiology and antiplatelet agents. 2010;48(s1):S3-S13.
15. Watson SP, Herbert JMJ, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(7):1457-67.
16. Berlanga O, Bori-Sanz T, James JR, Frampton J, Davis SJ, Tomlinson MG, et al. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(5):1026-33.
17. Manne BK, Badolia R, Dangelmaier C, Eble JA, Ellmeier W, Kahn M, et al. Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11557-68.
18. Kerrigan AM, Dennehy KM, Mourao-Sa D, Faro-Trindade I, Willment JA, Taylor PR, et al. CLEC-2 Is a Phagocytic Activation Receptor Expressed on Murine Peripheral Blood Neutrophils. *Journal of Immunology*. 2009;182(7):4150-7.
19. Fuller GLJ, Williams JAE, Tomlinson MG, Eble JA, Hanna SL, Pohlmann S, et al. The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(17):12397-409.
20. Vorland M, Thorsen VAT, Holmsen H. Phospholipase D in platelets and other cells. *Platelets*. 2008;19(8):582-94.
21. Zaid Y, Senhaji N, Naya A, Fadainia C, Kojok K. PKCs in thrombus formation. *Pathologie Biologie*. 2015;63(6):268-71.
22. Vilahur G, Gutierrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascular Pharmacology*. 2018;111:22-5.
23. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005;19(2):111-23.
24. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *British Journal of Haematology*. 2009;147(4):415-30.

25. Hagemeyer CE, Peter K. Targeting the Platelet Integrin GPIIb/IIIa. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(37):4119-33.
26. Bledzka K, Smyth SS, Plow EF. Integrin alpha Iib beta 3 From Discovery to Efficacious Therapeutic Target. *Circulation Research*. 2013;112(8):1189-200.
27. Austin SK. Haemostasis. *Medicine*. 2017;45(4):204-8.
28. Wheeler AP, Gailani D. The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2016;30(5):1099-114.
29. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(43):44250-7.
30. Travers RJ, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate, platelets, and coagulation. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2015;37:31-5.
31. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Polyphosphates: a link between platelet activation, intrinsic coagulation and inflammation? *Expert Review of Hematology*. 2010;3(3):269-72.
32. Mussano F, Genova T, Munaron L, Petrillo S, Erovigni F, Carossa S. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets*. 2016;27(5):467-71.
33. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. 2007;45(2):27-37.
34. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Immunology*. 2008;125:14-.
35. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 Forms an IL-1 β -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity*. 2004;20(3):319-25.
36. Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Andrade FB, et al. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020;108(4):1157-82.

37. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood*. 2019;133(9):906-18.
38. Wan P, Tan X, Xiang Y, Tong HS, Yu M. PI3K/AKT and CD40L Signaling Regulate Platelet Activation and Endothelial Cell Damage in Sepsis. *Inflammation*. 2018;41(5):1815-24.
39. Qiao JL, Arthur JF, Gardiner EE, Andrews RK, Zeng LY, Xu KL. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biology*. 2018;14:126-30.
40. Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. The Signaling Role of CD40 Ligand in Platelet Biology and in Platelet Component Transfusion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(12):22342-64.
41. Michel NA, Zirlik A, Wolf D. CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis-An Update. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2017;4:18.
42. Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Ascierio PA, Botti G, Barletta E, et al. CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms. *Tumori Journal*. 2002;88(5):361-6.
43. vanKooten C, Banchereau J. Functional role of CD40 and its ligand. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1997;113(4):393-9.
44. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;67(1):2-17.
45. Daub S, Lutgens E, Münzel T, Daiber A. CD40/CD40L and Related Signaling Pathways in Cardiovascular Health and Disease—The Pros and Cons for Cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(22).
46. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfusion Medicine Reviews*. 2020;34(4):209-20.
47. Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-54.
48. Tang TT, Cheng X, Truong B, Sun LZ, Yang XF, Wang H. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021;219:20.

49. Subauste CS. The CD40-ATP-P2X(7) Receptor Pathway: Cell to Cell Cross-Talk to Promote Inflammation and Programmed Cell Death of Endothelial Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
50. Cognasse F, Duchez AC, Audoux E, Ebermeyer T, Arthaud CA, Prier A, et al. Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
51. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 2006;108(7):2455-62.
52. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thrombosis Research*. 2008;122(3):346-58.
53. Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood*. 2016;128(6):753-62.
54. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thrombosis Research*. 2013;131(3):191-7.
55. Li N, Yang H, Wang ML, Lu SQ, Zhang Y, Long MA. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Molecular Biology of the Cell*. 2018;29(4):408-18.
56. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alpha(L)beta(2) and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity*. 2004;20(4):393-406.
57. Horuk R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1994;15(5):159-65.
58. Weingart C, Nelson PJ, Kramer BK, Mack M. Dose dependent effects of platelet derived chondroitinsulfate A on the binding of CCL5 to endothelial cells. *Bmc Immunology*. 2008;9:7.
59. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AEI, Power CA, Baggiolini M, Wells TNC. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood*. 2000;96(13):4046-54.

60. Rainger GE, Chimen M, Harrison MJ, Yates CM, Harrison P, Watson SP, et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*. 2015;26(6):507-20.
61. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2015;114(3):449-58.
62. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews*. 2007;21(2):99-111.
63. Hidari KIPJ, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Enhances Tyrosine Phosphorylation and Activates Mitogen-activated Protein Kinases in Human Neutrophils*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(45):28750-6.
64. Perrin J, Morlon L, Vigneron C, Marchand-Arvier M. Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation as evaluated by thromboelastometry (ROTEM (R)). *Thrombosis Research*. 2008;121(5):647-52.
65. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide Stimulates Platelets through an IL-1 beta Autocrine Loop. *Journal of Immunology*. 2013;191(10):5196-203.
66. Faber DR, De Groot PG, Visseren FLJ. Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Obesity Reviews*. 2009;10(5):554-63.
67. Beaulieu LM, Lin E, Mick E, Koupenova M, Weinberg EO, Kramer CD, et al. Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1 β regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(3):552-64.
68. Freedman JE, Larson MG, Tanriverdi K, O'Donnell CJ, Morin K, Hakanson AS, et al. Relation of Platelet and Leukocyte Inflammatory Transcripts to Body Mass Index in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;122(2):119-U52.
69. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*. 2015;29(3):153-62.
70. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*. 2011;23(10):1515-27.

71. Li J, Kim K, Hahm E, Molokie R, Hay N, Gordeuk VR, et al. Neutrophil AKT2 regulates heterotypic cell-cell interactions during vascular inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(4):1483-96.
72. Giles JA, Greenhalgh AD, Denes A, Nieswandt B, Coutts G, McColl BW, et al. Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by blockade of platelet GPIIb/IIIa. *Immunology*. 2018;154(2):322-8.
73. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
74. Hamam HJ, Khan MA, Palaniyar N. Histone Acetylation Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Biomolecules*. 2019;9(1).
75. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*. 2009;30(11):513-21.
76. Li TW, Zhang ZY, Li XJ, Dong G, Zhang M, Xu Z, et al. Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020.
77. Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner WD, Klappacher M, Kofler B, Steinbacher P, et al. New Aspects on the Structure of Neutrophil Extracellular Traps from Chronic Obstructive Pulmonary Disease and In Vitro Generation. *Plos One*. 2014;9(5).
78. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, Muthu A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017;6.
79. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*. 2010;185(12):7413-25.
80. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
81. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science*. 2004;306(5694):279-83.
82. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XYA, Santy L, et al. PAD4 mediated histone hypercitullination induces heterochromatin decondensation and chromatin

unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.

83. Desai J, Kumar SV, Mulay SR, Konrad L, Romoli S, Schauer C, et al. PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *European Journal of Immunology*. 2016;46(1):223-9.

84. Chen X, Li WJ, Ren JM, Huang DL, He WT, Song YL, et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Research*. 2014;24(1):105-21.

85. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*. 2007;13(4):463-9.

86. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;99(1):153-62.

87. Schattner M. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019;105(5):873-80.

88. Kazzaz NM, Sule G, Knight JS. Intercellular Interactions as Regulators of NETosis. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.

89. Constantinescu-Bercu A, Grassi L, Frontini M, Salles-Crawley II, Woollard K, Crawley JTB. Activated α IIb β 3 on platelets mediates flow-dependent NETosis via SLC44A2. *eLife*. 2020;9:e53353.

90. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013;110(5):1035-45.

91. Demers M, Wagner DD. NETosis: A New Factor in Tumor Progression and Cancer-Associated Thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2014;40(3):277-83.

92. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(36):15880-5.

93. Wang Y, Xiao Y, Zhong L, Ye D, Zhang J, Tu Y, et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with beta-cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63:4239-48.
94. Qin J, Fu S, Speake C, Greenbaum CJ, Odegard JM. NETosis-associated serum biomarkers are reduced in type 1 diabetes in association with neutrophil count. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016;184:318-22.
95. Njeim R, Azar WS, Fares AH, Azar ST, Kassouf HK, Eid AA. NETosis contributes to the pathogenesis of diabetes and its complications. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2020;65(4):R65-R76.
96. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*. 2015;52:497-503.
97. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, et al. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5.
98. Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *Journal of Physiology-London*. 2011;589(17):4115-23.
99. Guo L, Rondina MT. The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
100. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(1):23-35.
101. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011;25(4):155-67.
102. Rosenblum WI. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *Journal of Vascular Research*. 1997;34(6):409-17.
103. Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke*. 2000;31(5):1153-61.
104. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: An in vivo perspective. *Journal of Immunology*. 2008;180(10):6439-46.

105. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;191(8):1413-22.
106. Giles JA, Greenhalgh AD, Denes A, Nieswandt B, Coutts G, McColl BW, et al. Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by blockade of platelet GPIb. *Immunology*. 2018;154(2):322-8.
107. Rawish E, Nording H, Munte T, Langer HF. Platelets as Mediators of Neuroinflammation and Thrombosis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
108. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, et al. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2014;40(7):724-35.
109. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *The Lancet*. 2005;365(9465):1163-74.
110. Karino T, Motomiya M. Flow through a venous valve and its implication for thrombus formation. *Thrombosis Research*. 1984;36(3):245-57.
111. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(12):2074-88.
112. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(1):136-44.
113. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(6):860-70.
114. Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011;106(5):827-38.
115. Mandel J, Casari M, Stepanyan M, Martyanov A, Deppermann C. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7).

116. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2012;32(9):2045-51.
117. Wang L, Tang CJ. Targeting Platelet in Atherosclerosis Plaque Formation: Current Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24).
118. Kasper B, Brandt E, Brandau S, Petersen F. Platelet Factor 4 (CXC Chemokine Ligand 4) Differentially Regulates Respiratory Burst, Survival, and Cytokine Expression of Human Monocytes by Using Distinct Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*. 2007;179(4):2584.
119. Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz K-L, Adelsberger H, et al. Activated Platelets Induce Monocyte Chemotactic Protein-1 Secretion and Surface Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Endothelial Cells. *Circulation*. 1998;98(12):1164-71.
120. von Hundelshausen P, Schmitt MMN. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Frontiers in Physiology*. 2014;5.