

Funciones inmunoregulatoras de las plaquetas y su rol en la enfermedad autoinmune

Immunoregulating functions of platelets and their role in autoimmune disease.

Lina Paola D'Atri

Instituto de Medicina Experimental (IMEX) CONICET-ANM

lpdatri@hematología.anm.edu.ar



Simposio Conjunto
SAH-CAHT

HEMATOLOGÍA, Vol 19: 239 - 244
Número Extraordinario
XXII CONGRESO
Octubre 2015

Palabras clave: Plaquetas,
Inmunidad,
Enfermedad autoinmune.

Keywords: Platelets,
Immunity,
Autoimmune disease.

Las plaquetas son células pequeñas y enucleadas que provienen de la formación de proplaquetas generadas por los megacariocitos en la médula ósea. Aunque son conocidas principalmente por mantener la integridad vascular, muchas líneas de investigación han destacado el rol de las plaquetas como potentes moduladoras y efectoras de procesos inflamatorios e inmunes. La capacidad de las plaquetas de regular estos procesos se debe a la habilidad de expresar y secretar una gran variedad de moléculas capaces de atraer e interactuar con los sistemas inmune innato y adquirido.

Existen aproximadamente un trillón de plaquetas circulantes en la sangre de un humano adulto, debido a que la vida media de una plaqueta es solo de 8-10 días, 100 billones de nuevas plaquetas deben producirse diariamente para mantener el número de

plaquetas normales. Teniendo en cuenta el alto número de plaquetas circulantes, y su habilidad para liberar mediadores inflamatorios, las plaquetas se han posicionado como las centinelas que pueden comunicarse rápidamente con las células del sistema inmune⁽¹⁾.

La vinculación entre la inmunidad y la hemostasia tiene origen en organismos inferiores como los invertebrados, donde un único tipo celular, el hemocito, media tanto funciones hemostáticas como de defensa contra patógenos. Los hemocitos son células nucleadas similares en estructura y función a los macrófagos de los vertebrados, son capaces de reconocer patrones moleculares de patógenos ya que expresan receptores de tipo toll (TLRs) y receptores tipo *scavengers*. Son capaces también de fagocitar patógenos y de liberar por degranulación una gran

variedad de péptidos antimicrobianos que no solo se unen sino que también secuestran y eliminan al organismo invasor. Estas mismas células, además de todas sus funciones inmunes, pueden iniciar y mantener la coagulación de la hemolinfa liberando factores pro-coagulantes en respuesta a la injuria tisular o disrupción del exoesqueleto. Interesantemente, algunas moléculas asociadas a patógenos como el lipopolisacárido (LPS), son capaces de gatillar la coagulación de la hemolinfa, de manera tal que el coágulo resultante es capaz de secuestrar y eliminar a la bacteria, destacando la relevancia de la superposición funcional de la hemostasia y la inmunidad en estos organismos inferiores⁽²⁾. Probablemente, durante la evolución las funciones hemostática e inmune de los hemocitos divergieron dando origen a plaquetas y leucocitos en los organismos más complejos. De manera similar a los hemocitos, las plaquetas sintetizan, expresan y secretan una gran variedad de moléculas que están relacionadas directamente a la inflamación y a la inmunidad.

La activación de las plaquetas frente al daño vascular, produce la expresión y liberación de una gran variedad de citoquinas, quimioquinas y moléculas de superficie que no solo participan en la hemostasia sino que además alertan al sistema inmune para promover el reclutamiento de leucocitos al tejido injuriado. Muchas de las moléculas con funciones inmunes son almacenadas dentro de los gránulos plaquetarios. Las plaquetas poseen tres diferentes tipos de gránulos, gránulos alfa, densos y lisosomas. Recientemente un posible nuevo tipo de gránulos ha sido descrito, denominados gránulos T⁽³⁾. Frente a la activación, las plaquetas degranulan secretando al medio extracelular mediadores solubles y expresando en su superficie proteínas de membrana.

Uno de los constituyentes de los gránulos alfa, que es expresado en la superficie de las plaquetas activadas, es la P-selectina, una molécula de adhesión que interacciona con la glicoproteína ligando de P-selectina (PSGL-1) expresado por las células inmunes. Esto media la adhesión de plaquetas activadas a monocitos, neutrófilos y linfocitos, formando complejos leucocitos-plaquetas que promueven el rodado y detención de los leucocitos sobre la superficie de las plaquetas adherentes causando la inflamación vascular⁽⁴⁾.

Dentro de los mediadores, que afectan a los procesos inflamatorio e inmune, liberados por las pla-

quetas se encuentran las quimioquinas y citoquinas almacenadas en los gránulos alfa, como el factor plaquetario 4 (PF4), RANTES, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) que aseguran el reclutamiento y adhesión de los leucocitos al sitio de injuriado. Otra de las citoquinas pro-inflamatorias derivadas de las plaquetas es la IL-1 β . La IL-1 β no es almacenada en gránulos, sino que es producida luego de la activación plaquetaria por el procesamiento del pre-mRNA de la IL-1 β , mediado por la caspasa-1, resultando en la liberación de la IL-1 β funcional⁽⁵⁾. La IL-1 β actúa sobre el endotelio promoviendo la expresión de moléculas de adhesión y liberación de citoquinas que actúan junto al proceso quimiotáctico para promover la adhesión de neutrófilos y monocitos.

Los gránulos densos de las plaquetas contienen, además de mediadores involucrados principalmente en la formación del trombo como el ADP, serotonina y péptidos anti-bacteriales denominados trombocidinas^(6, 7). La serotonina es captada del plasma por las plaquetas a través del transportador de serotonina (SERT) y luego almacenada en los gránulos densos. Una vez liberada por activación plaquetaria, la serotonina es capaz de inducir vasoconstricción, mejorar la capacidad de los monocitos de activar a las células T y reclutar a los neutrófilos al sitio de inflamación^(8, 9).

El rol de las plaquetas como células inmunes se debe también a la expresión en superficie de receptores para IgG (Fc γ RIIA), las proteínas co-estimuladoras del sistema inmune CD40 y CD40L y numerosos TLRs^(1, 6, 10). Las plaquetas expresan únicamente el receptor Fc γ RIIA, de baja afinidad para IgG. A través de este receptor las plaquetas pueden unir complejos inmunes y funcionar como vehículo de traslado de estos complejos para su destrucción por fagocitos^(11, 12).

Las plaquetas son la principal fuente de CD40L soluble (sCD40L), de hecho más del 90% del sCD40L es producido por plaquetas activadas, por lo que los niveles de esta molécula pueden ser indicadores de activación plaquetaria⁽¹³⁾. Las plaquetas expresan también CD40L en la superficie celular, y su receptor el CD40. El sCD40L produce la activación del endotelio, generando la expresión de moléculas de adhesión y síntesis de quimioquinas para facilitar el reclutamiento y adhesión de leucocitos. Es más,

el sCD40L se une a su receptor el CD40 expresado constitutivamente en linfocitos B, monocitos y macrófagos regulando la activación de estas células inmunes⁽¹⁴⁾. Además, el sCD40L derivado de las plaquetas puede promover la diferenciación de las células B y el *switch* de clases de las inmunoglobulinas, puede aumentar las respuestas celulares de linfocitos T CD8+ e interferir con la maduración de células dendríticas^(15, 16).

Los TLRs detectan patrones moleculares de patógenos y se expresan tanto en la superficie de la plaqueta como intracelularmente. Los patógenos o componentes de los mismos pueden unirse a los TLRs plaquetarios y de esta manera ser presentados a los neutrófilos y a células del sistema retículo-endotelial. De esta manera, la expresión de los TLRs en las plaquetas vincula la respuesta inmune innata con la adaptativa durante procesos infecciosos o inflamatorios. En este contexto, los TLR2 y TLR4 de las plaquetas reconocen componentes de la pared de bacterias Gram positivas o Gram negativas, respectivamente, promoviendo la formación de trampas extracelulares de ADN por los neutrófilos que pueden atrapar y eliminar a las bacterias^(17, 18). La activación de los TLRs intracelulares que reconocen ácidos nucleicos virales, puede contribuir tanto a la trombosis^(10, 19) como a la respuesta inmune viral sin inducir trombosis⁽²⁰⁾.

Las plaquetas han sido implicadas como participantes activos de varias patologías autoinmunes como la artritis reumatoidea, el lupus eritematoso, la esclerosis sistémica y la esclerosis múltiple.

La artritis reumatoidea (AR) es la principal poli-artritis inflamatoria caracterizada por la destrucción progresiva de las articulaciones sinoviales, como resultado de una inflamación crónica. Esta enfermedad está caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA). Los anticuerpos ACPA son específicos de la AR y reconocen péptidos citrulinados de fibrinógeno, vimentina, colágeno tipo II y enolasa. Las plaquetas de los pacientes con AR son hiper-respondedoras a la activación *in vitro*, además en estos pacientes se encuentran niveles incrementados de micropartículas en plasma y de marcadores de activación plaquetaria solubles como P-selectina y CD40L⁽²¹⁾. Uno de los hallazgos más llamativos dentro de esta patología fue el realizado por Boilard y col. que describieron la presencia de micropartículas plaquetarias en el

fluido sinovial de pacientes con AR. Estas micropartículas se generan localmente por la activación de las plaquetas en la vasculatura de la articulación durante la artritis. Cuando las plaquetas interactúan con la matriz extracelular se produce la activación de la GPVI plaquetaria, el receptor para colágeno y laminina, lo que induce la liberación de micropartículas conteniendo IL-1 (tanto IL-1 α como IL-1 β), estas micropartículas inducen la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-8 por parte de los sinoviocitos tipo fibroblastos. Más aún, los autores muestran en un modelo murino, que las plaquetas son críticas para el desarrollo de la artritis inflamatoria⁽²²⁾. Las plaquetas participan además generando prostaglandina H2 que es convertida por los sinoviocitos tipo fibroblastos en prostaglandina I2, un mediador inflamatorio encontrado en altas concentraciones en el líquido sinovial de estos pacientes⁽²³⁾. Por otro lado, el estudio realizado por Cloutier y col. demostró que las mismas plaquetas promueven la permeabilidad vascular, a través de la liberación de serotonina, formando espacios entre las células endoteliales que permiten el paso de las micropartículas y de los complejos inmunes dentro del líquido sinovial⁽²⁴⁾.

Estudios recientes muestran que las plaquetas de los individuos con AR pueden ser activadas por los ACPA a través del Fc γ RIIA plaquetario en etapas tempranas de la enfermedad⁽²⁵⁾. Todos estos hallazgos revelan un papel fundamental de las plaquetas en los eventos inflamatorios durante el desarrollo de la AR.

El lupus eritematoso sistémico (LES), es una enfermedad reumática autoinmune caracterizada por una inflamación sistémica que afecta a varios sistemas de órganos, incluyendo articulaciones, riñón, piel y sistema nervioso central. Existen múltiples evidencias de activación plaquetaria durante el LES, como niveles elevados de P-selectina, agregados leucocitos-plaquetas y micropartículas plaquetarias. Las vías por las cuales las plaquetas se activan en LES pueden involucrar citoquinas inflamatorias, la acumulación del fragmento 4d del complemento en la superficie plaquetaria y el reconocimiento de complejos inmunes a través del Fc γ RIIA. Los niveles de C4d unido a las plaquetas correlacionan con la actividad de la enfermedad y se asocia con la presencia de auto-anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL). Debido a los altos niveles de aPL, que se unen a las plaque-

tas activándolas, los pacientes con LES tienen un mayor riesgo trombótico⁽²¹⁾. Las plaquetas han sido asociadas al desarrollo de esta patología, ya que son la principal fuente de CD40L, un marcador de inflamación vascular característico del lupus. El CD40L expresado por las plaquetas y sus micropartículas es capaz de modular la inmunidad adaptativa por su habilidad de activar células presentadoras de antígenos como las células dendríticas. Cuando las plaquetas se activan al reconocer complejos inmunes, interactúan con las células dendríticas mieloides y plasmocitoides a través del CD40L, promoviendo la síntesis de IFN- α ⁽²⁶⁾. En conclusión, las plaquetas no solo participan en los eventos trombóticos característicos de esta patología, sino que también amplifican de manera directa la respuesta inflamatoria en LES.

La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune con un gran espectro de manifestaciones clínicas, caracterizada por daño orgánico múltiple. Los principales marcadores pato-fisiológicos son la deposición excesiva de tejido conectivo, inflamación, autoinmunidad, y disfunción vascular. Las plaquetas de estos pacientes detectan la disrupción de la integridad vascular y entran en un proceso de activación rápida y persistente, donde se liberan grandes cantidades de VEGF, PDGF, TGF β y serotonina. Además muestran agregación incrementada, mayor unión a fibrinógeno, aumento en los niveles de expresión de P-selectina, y mayor producción de micropartículas conteniendo la proteína HMGB1 (del inglés: high-mobility group-B1) que correlaciona con la actividad de la enfermedad. La proteína HMGB1 es una alarmina, liberada por células necróticas, y que también puede ser excretada por plaquetas y células inmunes activadas⁽²⁷⁾. HMGB1 actúa como regulador de la inmunidad innata y adquirida ya que incrementa los niveles de expresión de moléculas de adhesión necesarias para el reclutamiento de leucocitos por células endoteliales activadas. Además, HMGB1 puede inducir también la secreción de citoquinas inflamatorias y promover la maduración de las células dendríticas⁽²⁸⁾. Recientemente se demostró que el estado oxidativo característico de la esclerosis sistémica, genera la oxidación de HMGB1 contribuyendo a la habilidad de las plaquetas activadas y micropartículas de mantener el estado activado de los neutrófilos y monocitos circulantes en esta patología⁽²⁹⁾.

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa inflamatoria y autoinmune del sistema nervioso central. Las plaquetas de estos pacientes presentan un mayor grado de activación ya que expresan mayores niveles de P-selectina y una producción incrementada de micropartículas⁽³⁰⁾. Además, se han identificado plaquetas en las lesiones de pacientes con esclerosis múltiple y aunque la mayoría de los estudios se han realizado en un modelo murino de encefalitis autoinmune, algunos hallazgos postulan que las plaquetas contribuyen a la patogénesis de la encefalitis autoinmune promoviendo la inflamación del sistema nervioso central a través de la GPIb y la GPIIb/IIIa⁽³¹⁾.

Resulta cada vez más evidente que las plaquetas participan, además de salvaguardar la integridad de la vasculatura, en diferentes procesos como la angiogénesis, la inflamación y la inmunidad. Dado su gran número en circulación, las plaquetas actúan como centinelas detectando posibles infecciones, activando a células del sistema inmune e incluso eliminando patógenos con su arsenal de factores inmunoreguladores. En el contexto de las enfermedades autoinmunes, las plaquetas son activadas por la presencia de complejos inmunes, factores del complemento o proteínas de matriz extracelular. Esta activación las convierte en participantes clave del desarrollo y progresión de estas patologías volviéndolas nuevos blancos de posibles terapéuticas.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J, Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* 2011; 11: 264-74.
2. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K, Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 2006; 211: 213-36.
3. Thon JN, Peters CG, Machlus KRy col., T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *The Journal of cell biology* 2012; 198: 561-74.

4. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G, Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis research* 2012; 129: 263-6
5. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA y col., Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of cell biology* 2001; 154: 485-90.
6. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL, Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 2014; 123: 2759-67.
7. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J y col., Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 20374-81.
8. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M y col., Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 2013; 121: 1008-15.
9. Soga F, Katoh N, Inoue T, Kishimoto S, Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *The Journal of investigative dermatology* 2007; 127: 1947-55.
10. D'Atri LP, Etulain J, Rivadeneyra L y col., Expression and functionality of Toll-like receptor 3 in the megakaryocytic lineage. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2015; 13: 839-50.
11. Huang ZY, Chien P, Indik ZK, Schreiber AD, Human platelet Fc gamma RIIA and phagocytes in immune-complex clearance. *Molecular immunology* 2011; 48: 691-6.
12. King M, McDermott P, Schreiber AD, Characterization of the Fc gamma receptor on human platelets. *Cellular immunology* 1990; 128: 462-79.
13. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 2009; 102: 206-14.
14. Henn V, Slupsky JR, Grafe M y col., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
15. Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA, Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thrombosis research* 2011; 127: 180-3.
16. Kissel K, Berber S, Nockher A y col., Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion* 2006; 46: 818-27.
17. Clark SR, Ma AC, Tavener SA y col., Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 2007; 13: 463-9.
18. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L y col., Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap (NET) formation mediated by activated platelets. *Journal of leukocyte biology* 2016; 99:
19. Panigrahi S, Ma Y, Hong L y col., Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circulation research* 2013; 112: 103-12.
20. Koupenova M, Vitseva O, Mackay CR y col., Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* 2014;
21. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA, Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature reviews. Rheumatology* 2012; 8: 534-42.
22. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K y col., Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327: 580-3.
23. Boilard E, Larabee K, Shnyder Ry col., Platelets participate in synovitis via Cox-1-dependent synthesis of prostacyclin independently of microparticle generation. *Journal of immunology* 2011; 186: 4361-6.

24. Cloutier N, Pare A, Farndale RW y col., Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* 2012; 120: 1334-43.
25. Habets KL, Trouw LA, Levarht EW y col., Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2015; 17: 209.
26. Duffau P, Seneschal J, Nicco C y col., Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 2010; 2: 47ra63.
27. Habets KL, Huizinga TW, Toes RE, Platelets and autoimmunity. *European journal of clinical investigation* 2013; 43: 746-57.
28. Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME, HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity* 2007; 40: 285-9.
29. Maugeri N, Rovere-Querini P, Baldini M y col., Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: a candidate for microvessel injury in systemic sclerosis. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20: 1060-74.
30. Sheremata WA, Jy W, Horstman LL y col., Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 2008; 5: 27.
31. Langer HF, Choi EY, Zhou H y col., Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circulation research* 2012; 110: 1202-10.