

Fisiología de la función plaquetaria

Physiology of platelet function

Alberto MF¹, Asensio M¹, Sánchez-Luceros A^{1,2}

*Departamento de Hemostasia y Trombosis, ¹IIHEMA, ²IMEX-CONICET,
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.*

fabiana@hematología.anm.edu.ar



IV CURSO EDUCACIONAL
DE LA ISTH - BLOQUE 2
PLAQUETAS

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 • Número Extraordinario
XIII Congreso del Grupo CAHT: 231-237
Septiembre 2018

Palabras claves: plaquetas,
agonistas,
inhibidores.

Keywords: platelets,
agonist,
inhibitors.

Hacia un cambio del enfoque del funcionamiento de las plaquetas: que el árbol no tape al bosque

La respuesta hemostática a la injuria vascular es un proceso dinámico, que requiere una rápida adhesión y activación de las plaquetas para formar un tapón localizado en el sitio del daño endotelial. De este modo se limita la pérdida de sangre y se generan las condiciones óptimas para la reparación de los sitios lesionados. Sin embargo, la capacidad de activación de las plaquetas también constituye el origen de su rol patológico en la enfermedad vascular oclusiva, donde la formación del trombo plaquetario se inicia por un estímulo inapropiado como ser la

ruptura de una placa aterosclerótica.

La manera en la cual las plaquetas responden a su entorno (referida como función plaquetaria), define su habilidad para cumplir con este rol, tanto en la hemostasia (mecanismo homeostático fisiológico) como en la enfermedad (aterotrombosis). Los estímulos que las plaquetas van encontrando en su tránsito por el sistema vascular son complejos, así como las vías de señalización que disparan y regulan las respuestas a los mismos.

A fin de organizar la comprensión del funciona-

miento plaquetario dentro del sistema circulatorio, se deben considerar en conjunto tres tipos de señales y sus vías de señalización:

- las señales inhibitorias: que son las que genera la pared endotelial sana y mantienen a las plaquetas en estado inactivo.
- las señales de activación: que se presentan cuando se produce daño vascular y disparan inmediatamente la adhesión y agregación de las plaquetas.
- las señales regulatorias negativas: que también se ponen en marcha una vez que se inicia la activación y proporcionan el mecanismo de control, que limita la formación del tapón hemostático y aseguran el éxito del proceso fisiológico.

Por lo tanto, en su tránsito por el sistema vascular las plaquetas experimentan numerosos estímulos extracelulares al mismo tiempo y responden a combinaciones complejas de señales de activación primaria y secundaria, sumado a las señales inhibitorias opuestas.

A lo largo de los años, la comprensión de tales mecanismos se ha ido construyendo en base a modelos experimentales, simplificados como caminos lineales donde cada mecanismo es disparado en respuesta a un estímulo individual. Esta aproximación simplificada es útil a nivel experimental, para delinear el orden de eventos que se desencadenan luego de la activación. Sin embargo es necesario tener una visión más sofisticada, a fin de comprender cómo agonistas múltiples entrecruzan sus caminos de señalización para dar origen a un sistema de “redes de señalización”. No obstante, para entender cómo funcionan las redes de señalización debemos cambiar nuestra manera de pensar el funcionamiento individual, lineal, hacia un enfoque sistemático.

Pero, ¿qué significa enfoque sistemático? Denominado también como enfoque de sistema, significa que el modo de abordar los objetos y fenómenos no puede ser aislado, sino que tienen que verse como parte de un todo. No es la suma de elementos, sino un conjunto de elementos que se encuentran en interacción, de forma integral y como conjunto producen nuevas cualidades en el sistema, con un resultado que es superior al de los componentes individuales y por lo tanto provoca un salto de calidad. Este cambio en el enfoque de la función plaquetaria será fundamental para sostener el desarrollo de nuevas estrategias de la terapia con antiplaquetarios, de

nuevas metodologías diagnósticas y la comprensión de los efectos secundarios, a nivel hemostático, de las drogas no dirigidas a las plaquetas.

Reguladores de la inhibición plaquetaria: cuando el bosque está en calma

Durante su tránsito dentro de la vasculatura, las plaquetas existen en un entorno complejo y fluido donde los factores reológicos y hemodinámicos fuerzan a las plaquetas a estar muy cerca de la pared del vaso. Las señales generadas por vasos sanguíneos intactos y sanos promueven el estado de inactividad y permiten que las plaquetas circulen en estado de reposo⁽¹⁾. Sin mecanismos inhibidores, las plaquetas se activarían incluso en ausencia de señales de activación. Las circunstancias en las que estas señales inhibitorias son defectuosas o en las que existe una exposición inadecuada a los factores de activación, pueden provocar una activación plaquetaria patológica y conducir a la enfermedad vascular oclusiva del territorio coronario o cerebral⁽²⁾.

Las vías de señalización inhibitorias son relativamente pocas, pero suprimen varios nodos claves en la red de señalización que sostiene la activación plaquetaria. Las células endoteliales sanas sintetizan los dos inhibidores claves de la activación plaquetaria: el óxido nítrico (ON) y la prostaciclina (PGI₂), que regulan los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares que, a su vez, regulan la actividad la proteína quinasa G (PKG) y proteína quinasa A (PKA) y de este modo el estado de reactividad plaquetaria. El ON mantiene a las plaquetas en estado de reposo a partir de la regulación positiva de la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCS), lo que aumenta la concentración intracelular de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y el aumento de GMPc la actividad PKG.

La PGI₂ se une al receptor de prostaglandina, que forma parte de la familia de receptores de siete dominios de transmembrana acoplados a proteína G regulatoria (GPCRs), sobre la superficie de la plaqueta y activa la sub-unidad regulatoria Gas de la proteína G. Gas aumenta la actividad de la adenilato ciclasa, que conduce a un aumento de la concentración de adenosín monofostasto cíclico (AMPc) y de esta manera a un aumento de la actividad PKA.

PKG y PKA tienen múltiples sustratos compartidos:

- Rap1: que controla la activación de la integrina GPIIb-IIIa.

- CALDAG-GEFI: que controla la actividad de Rap1.
- Receptor de IP3: que regula la liberación de calcio intracelular.

También existen sustratos exclusivos de PKA:

- $G\alpha_{13}$ y $GP1b\beta$: que son proteínas involucradas en el proceso de adhesión celular y lamelipodia.

Y sustratos exclusivos de PKG:

- Fosfodiesterasa 2A y 5A: que degradan el AMPc y el GMPc.
- Fosfodiesterasa 3A: que reduce el nivel de AMPc constitutivo.

Otro de los mecanismos inhibitorios, es el ejercido por las adepasas o ectonucleasas (CD39), que son enzimas presentes en la membrana de eritrocitos y células endoteliales que hidrolizan el ADP y el ATP (agonistas plaquetarios) a adenosina⁽³⁾. La adenosina activa un GPCR acoplado a una Gs que causa inhibición de las plaquetas a partir del aumento de AMPc⁽⁴⁾.

Reguladores claves de la activación: cuando el bosque está en peligro

Cuando se produce daño endotelial, las señales inhibitorias endógenas son superadas por las de activación para permitir reaccionar a las plaquetas de manera rápida y limitar la pérdida de sangre. En la unidad microvascular (arteriolas, capilares y vénulas), las plaquetas circulan próximas a la pared vascular. A esta altura del árbol vascular, la presión que la sangre ejerce sobre la pared vascular es máxima (alta fuerza de cizallamiento). Estas características de la unidad microvascular hacen que las plaquetas tomen contacto de manera muy efectiva con las proteínas de la matriz extracelular del endotelio, como los colágenos y factor de von Willebrand (VWF), y en consecuencia que se adhieran, activen y agreguen para formar el tapón hemostático plaquetario. La presencia de alta fuerza de cizallamiento facilita la unión de las plaquetas a las matrices de colágeno, vía el VWF y la glicoproteína IbIXV (GPIbIXV). Esta unión, que es reversible o intermitente, genera activación de las plaquetas y permite que la GPVI pueda unirse al colágeno, reforzando el estado de activación y conduciendo a activación de las integrinas (GPIaIIa y GPIIbIIIa), dando lugar a una adhesión firme y estable a la matriz sub-endotelial⁽⁵⁾.

En el proceso de activación las plaquetas liberan sus gránulo y, por lo tanto, el ADP contenido en los gránulos densos, sintetizan tromboxano A2 (TxA2) y colaboran con la generación de trombina a partir de la exposición de fosfatidilserina. ADP, TxA2 y trombina son agonistas plaquetarios solubles, que estarán en alta concentración en la proximidad de la barrera de plaquetas adherentes y permitirán reclutar a otras plaquetas en circulación para ir construyendo el tapón hemostático estable⁽⁵⁾.

Estos agonistas solubles activan las plaquetas vía diferentes GPCRs y regulan un conjunto de mediadores de señalización que conducen a la agregación. Aquí podemos distinguir tres familias de proteínas que pueden considerarse nodos de regulación de las redes de activación⁽⁶⁾ (Figura):

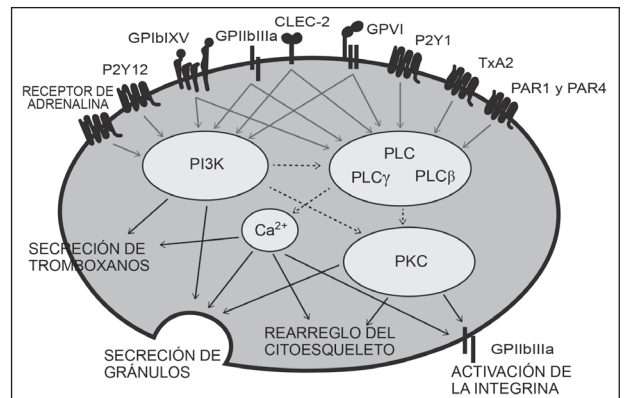


Figura. El concepto de los nodos de señalización de la activación. Los principales receptores de agonistas activan al menos uno de los mediadores de señalización claves de la activación plaquetaria: PLC, PKC o PI3K. Estos nodos de señalización coordinan la secreción de agonistas solubles, la activación de las integrinas y las modificaciones del citoesqueleto.

- las fosfolipasas C (PLC),
- las proteínas quinasas C (PKC) y
- la familia de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K).

Los nodos regulatorios coordinan dos procesos claves de la activación plaquetaria: la secreción y la activación de las integrinas.

Los miembros de la familia de PLC catalizan la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP2). PIP2 es uno de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular. Su hidrólisis genera diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG activa corriente abajo a PKC, e IP3 a su receptor presen-

te en las membranas que rodean al sistema tubular denso (reservorios intracelulares de calcio), generando un flujo de calcio hacia el citosol. Tanto el aumento del calcio intracelular y como la activación de PKC serán indispensables para la activación de las integrinas y la secreción plaquetaria.

PLC γ 2 y PLC β son las isoformas de la familia PLC presentes en las plaquetas. De qué manera y en qué momento se activan, tendrá un impacto clave sobre la activación plaquetaria. PLC γ 2 lo hace corriente abajo de los receptores de adhesión GPIbXIV, GPVI y el receptor 2 de tipo lectina C (CLEC-2)⁽⁷⁾. PLC β lo hace corriente abajo de los GPCRs y por lo tanto de los agonistas solubles (ADP, TxA2 y trombina). La activación de PLC β es la vía principal de liberación de calcio y activación de PKC, en plaquetas que no están en contacto directo con las proteínas de la matriz extracelular.

Las isoformas de PKC identificadas en plaquetas pueden dividirse en tres sub-tipos:

- las isoformas convencionales (PKC α , PKC β y PKC γ) que requieren DAG y calcio para lograr una activación completa.
- las isoformas nuevas (PKC δ , PKC θ , PKC η y PKC ϵ) que sólo requieren unión a DAG.
- las isoformas atípicas (PKC ζ y PKC1/ λ) que son independientes de DAG y calcio.

La combinación de estudios con modelos de ratones deficientes en las diferentes isoformas, así como el empleo de inhibidores de amplio espectro, sugieren una serie de roles idénticos y superpuestos de las isoformas de PKC, en la regulación de la secreción de gránulos, la síntesis de TxA2 y la activación de las integrinas⁽⁸⁾. Los sustratos de las isoformas incluyen: componentes de la maquinaria secretoria (SNAP23, sintaxina4, Muvc18) y proteínas asociadas al citoesqueleto (pleckstrina, MARCKS, VASP)⁽⁸⁾.

PI3K también presenta diferentes isoformas, PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ . Todas las isoformas tienen la capacidad para fosforilar al PIP2 y generar fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3)⁽⁹⁾. El aumento de PIP3 facilita el reclutamiento de determinadas proteínas a la membrana plasmática, facilitando el encuentro de las quinasas de señalización muy cerca de sus efectores corriente abajo. Por ejemplo, la Ser/Thr-quinasa proteína-quinasa B (Akt), que ejerce algunos de sus efectos a través de la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). La inhibición

de GSK3 potencia las respuestas a la trombina pero no a los agonistas de GPVI. Tras la estimulación con trombina, PKC α media la fosforilación temprana de GSK3 mientras que la fosforilación por Akt se produce de manera posterior. Proteínas quinasas activadas por mitógeno, como la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), también son efectores corriente abajo de PI3K. PI3K tiene un papel importante en la regulación de PLC γ .

Eventos clave durante la activación plaquetaria: manos a la obra

Re-arreglo del citoesqueleto

La activación plaquetaria genera cambios importantes en el citoesqueleto de actina, que sostienen el cambio de forma, la emisión de pseudópodos (filopodia), y la extensión de las plaquetas (lamelipodia), cuando éstas entran en contacto con las superficies adhesivas. El cambio de forma ocurre rápidamente y genera formación de pseudópodos que aumentan el área de superficie de contacto entre las plaquetas. El cambio de forma depende de la elevación del calcio intracelular, producido por las sub-unidades de los GPCRs, G α_q y/o G α_{13} . La reorganización del citoesqueleto permite la centralización de los gránulos y las organelas de las plaquetas, la formación de filopodios transitorios y la formación sostenida de lamelipodia. La reorganización rápida del citoesqueleto de actina se caracteriza por una combinación de procesos que incluyen la liberación de los extremos de polimerización (destapado), corte, nucleación, y la activación de miosina II. Entre las proteínas regulatorias de estos procesos se encuentran: las Rho GTPases Rac, Cdc42, RhoA, VASP y PKC⁽¹⁰⁾.

Secreción de mediadores secundarios

La secreción o liberación de mediadores secundarios es crítica para la retroalimentación positiva que respalda la consolidación del tapón y sirve como activación primaria en las plaquetas que se encuentran en circulación, próximas a un tapón establecido y en crecimiento. El ADP y el TxA2 son los mediadores secundarios más importantes y, al igual que la activación de GPIIb/IIIa, la secreción, depende de varias vías de señalización convergentes activadas por múltiples receptores.

Las plaquetas presentan diferentes tipos de gránulos. Entre ellos los gránulos densos que almacenan ADP y 5-hidroxitriptamina, y los gránulos α que

contienen proteínas de la coagulación, proteínas adhesivas, proteínas propias de las plaquetas, factores de crecimiento, etc. Los mecanismos que rigen la secreción de ambos tipos de gránulos son comparados e implican la formación de un complejo de secreción que está formado por: el receptor de proteínas de unión asociadas a NSF soluble (SNARE), proteínas de membrana vesícula- asociadas (VAMP)⁽¹¹⁾, y reguladores de SNARE (como Munc13-4)⁽¹²⁾. El aumento del calcio intracelular juega un rol fundamental en la secreción de gránulos en todos los tipos de células. En las plaquetas también, pero sus vías de señalización no están completamente caracterizadas. A modo de hipótesis, se presume que la proteína calmodulina media la fosforilación de la cadena liviana de miosina⁽¹³⁾, lo que conduce a la interacción con VAMP y con la maquinaria celular exocítica, causando la secreción de gránulos⁽¹⁴⁾.

La activación de PKC mediada por miméticos del DAG y el phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA), induce la secreción de gránulos en ausencia de aumento del calcio intracelular⁽¹⁵⁾. En general, las isoformas de PKC tienen una regulación positiva sobre la secreción. Entre los sustratos candidatos a regulación figuran: Munc18c, syntaxina-4 y SNAP23⁽⁸⁾. TxA2 se sintetiza *de novo* tras la activación plaquetaria. La síntesis es mediada por una cascada de enzimas, incluida la ciclooxigenasa-1 (diana de la aspirina) y se produce cuando se dispone del ácido araquidónico a partir de su liberación de la membrana plasmática por efecto de la fosfolipasa A2. El aumento del calcio intracelular genera translocación de fosfolipasa A2 y activación mediante su fosforilación por las quinasas de estrés (P38MAPK y ERK1). El ADP por medio del GPCR P2Y12, genera TxA2 dependiente de PI3K que potencia la producción dependiente de la elevación del calcio intracelular⁽¹⁶⁾.

Activación de las integrinas

La activación de GPIIb/IIIa representa el punto final de las vías de señalización plaquetarias, ya que la mayoría de ellas (inhibidoras y activadoras) contribuyen de algún modo a su regulación. La activación involucra un cambio a nivel conformacional de la integrina, que le permitirá unir fibrinógeno y VWF con alta afinidad. Sin esta capacidad las plaquetas no pueden adherirse entre sí y formar agregados. Talina y kindlina son moléculas regulatorias impor-

tantes en este proceso y se encuentran asociadas a dominios citoplasmáticos de la integrina. A nivel citoplasmático, la regulación de la actividad de la pequeña GTPasa Rap1 es el punto donde convergen diferentes vías de activación⁽¹⁷⁾. El aumento del calcio intracelular modula la activación de Rap1 a través de CalDAG-GEFI⁽¹⁸⁾. La activación de PI3 también modula la actividad de Rap1⁽¹⁹⁾. Recientemente, se ha demostrado, que PI3K actúa inhibiendo una proteína activadora de GTPasa, RASA3 (que regula negativamente la activación de Rap1)⁽²⁰⁾. Este mecanismo podría explicar por qué los activadores de PI3K, como el receptor del ADP P2Y12, no pueden provocar activación de GPIIb/IIIa, a menos que haya regulación positiva a través del aumento del calcio o PKC de manera simultánea.

Retroalimentación negativa y autorregulación: la sabiduría de decidir hasta cuándo

Luego del inicio de la activación plaquetaria y la formación del tapón plaquetario, los mecanismos de señalización negativos restringen esta activación, para evitar que la agregación plaquetaria progrese fuera de control y se produzca un exceso de respuesta que comprometa el éxito homeostático.

Las vías que contribuyen a la regulación negativa no han sido tan estudiadas como las que median la activación. Por lo tanto se presume que reguladores negativos como los receptores que contienen el motivo de inhibición de inmunorreceptor tirosina (ITIM), reducen la activación de los nodos PLC, PI3K y de GPIIb/IIIa⁽²¹⁾. Otros mecanismos inhibidores endógenos incluyen la molécula de adhesión selectiva de células endoteliales (ESAM), Wnt- β -catenina y semaforina 3A (Sema3A) que regulan negativamente la actividad de GPIIb/IIIa; las fosfatasa que limitan los mecanismos dependientes de fosforilación⁽²²⁾ y la pérdida de sensibilidad e internalización de los GPCRs⁽²³⁾.

La secuencia de consenso ITIM (L/I/V/S-x-Y-x-x-L/V) presente en dominios citoplasmáticos, ha sido identificada en varias proteínas que se expresan en plaquetas. Por ejemplo: la molécula 1 de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM-1), la molécula 1 de adhesión celular antígeno carcinoembrionario (CEACAM-1), la molécula 2 de adhesión celular antígeno carcinoembrionario (CEACAM-2), G6b-B y el receptor B tipo inmunoglobulina asociado a LILRB2 (PIRB). PIRB se activa mediante la unión

a su ligando endógeno, ANGPTL2, que es secretado por las plaquetas. PECAM-1 lo hace por la agrupación de receptores mediante interacciones homófilas. La activación de los receptores ITIM, conduce al reclutamiento de las fosfatasa SHP1 / SHP2 y SHIP1 / SHIP2 junto al receptor y de esta manera las localiza muy cerca de sus sustratos⁽²²⁾.

Las proteínas que contienen ITIM son consideradas como el “interruptor” de desactivación que contrarresta la activación iniciada por receptores portadores de ITAM (GPVI-FcR γ / Fc γ RIIA, y CLEC-2). Sin embargo, existen evidencia experimental de que PECAM-1, G6b-B, y LILRB2 / PIRB producen regulación negativa sobre los GPCRs y sobre GPIIb/IIIa. La activación de proteínas por fosforilación de residuos tirosina, serina y treonina es un mecanismo reversible clave de la transducción de señales. La defosforilación por fosfatasa dará origen a una regulación bidireccional de la transducción de señales y, por lo tanto, de la función plaquetaria. La defosforilación en las plaquetas será ejecutada por las fosfatasa, que incluyen SHP1/SHP2, SHIP1/SHIP2, proteína fosfatasa (PP) 2, fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) y ligando de ubiquitina de células T-2 (TULA2). Las acción de las fosfatasa conducirá a una regulación negativa de la movilización de calcio intracelular, la secreción de gránulos y la activación de GPIIb/IIIa. SHP2 tiene funciones en la regulación negativa de la señalización plaquetaria corriente abajo de GPCR y GPVI, y es un mediador clave de la señalización del receptor ITIM corriente abajo de PECAM-1 y CEACAM-1⁽²²⁾. TULA2 defosforila e inactiva Syk, evitando la activación plaquetaria mediada por GPVI⁽²⁴⁾. PTEN y SHIP1 antagonizan la función de PI3K⁽²⁵⁾.

El proceso de pérdida de sensibilidad de los GPCRs incluye la inactivación a través de eventos de fosforilación sobre el receptor y la internalización de los mismos que disminuye la expresión en la membrana plasmática⁽²³⁾. Como se describió previamente, el ADP es una agonista crítico de la activación plaquetaria, sin embargo los receptores para ADP pierden sensibilidad rápidamente después de su exposición al ADP. Los receptores de trombina, luego de activación se internalizan o eliminan en micropartículas de membrana, dando como resultado una disminución en el número de receptores en la superficie de las plaquetas post-estimulación⁽²⁶⁾.

Perspectivas

En las últimas décadas, hemos experimentado un crecimiento exponencial sobre la comprensión de las vías de señalización plaquetaria. Describir la señalización que sustenta la función plaquetaria como una red, gatillada por la participación de diferentes agonistas e inhibidores, resulta un enfoque no sólo lógico sino también más fisiológico. La gran cantidad de datos que describen a los componentes dentro de esta red, plantea desafíos con respecto a la manera de interpretar y transformar esta información en estrategias a nivel diagnóstico y mejoras en el aspecto terapéutico.

Los enfoques de sistemas, que utilizan modelos in vivo para medir en tiempo real y bajo condiciones fisiológicas la organización de la respuesta hemostática a la injuria, han introducido un nuevo modelo de la estructura del tapón hemostático. De acuerdo a la información obtenida aplicando la microscopía intravital, luego de una injuria penetrante se genera una organización jerárquica del tapón hemostático, que es el resultado de la interacción entre la función de las plaquetas, los diferentes estímulos y las condiciones de flujo en tiempo real⁽²⁷⁾. En el nuevo modelo, el tapón hemostático se encuentra constituido por un “core”, denso, formado por plaquetas degranuladas, muy activadas, cuya formación depende de la generación de trombina en el sitio de injuria y donde el grado de compactación entre las plaquetas evita la difusión de la misma. Una malla de fibrina se extiende por debajo del “core” confinada al espacio perivascular⁽²⁸⁾. Este “core” se encuentra rodeado por un “caparazón” de plaquetas parcialmente activadas, que forman una malla con una trama más laxa, que permite la difusión de las proteínas plasmáticas y de los metabolitos secretados por el “core” de plaquetas degranuladas. La formación del “caparazón” es conducida por los gradientes de ADP y TxA2 generados por el balance entre lo que se libera a partir del “core” de plaquetas altamente activadas y el flujo sanguíneo en el sitio de injuria⁽²⁹⁾. Este modelo, que ha sido desarrollado en ratones, necesita ser extrapolado a nivel humano donde también deberá evaluarse la variabilidad a nivel poblacional.

La comprensión de las redes de señalización plaquetaria, a partir de su modelización con ayuda de programas de análisis, es otra de las direcciones a seguir⁽²⁴⁾. Esto permitirá entender cómo combina-

ciones de factores reguladores contribuyen colectivamente a la función plaquetaria y predecir cómo los cambios, dentro de partes específicas de la red, alteran la reactividad plaquetaria o los niveles de activación. En conjunto, la nueva información ayudará en la selección de proteínas (individuales o en combinación) que representen nuevos objetivos de la terapia con anti-trombóticos y también a comprender los defectos asociados con un mayor riesgo de sangrado o de trombosis.

Declaración de conflictos de interés:

Las autoras declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kuiken GD, Sixma JJ, Heethaar RM. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 819-24.
2. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 167-76.
3. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH y col. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1351-60.
4. Johnston-Cox HA, Ravid K. Adenosine and blood platelets. *Purinergic Signalling*. 2011; 7: 357-65.
5. Brass LF, Wannemacher KM, Ma P, Stalker TJ. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost*. 2011; 9 (suplemento 1):66-75.
6. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost*. 2016; 14:918-30.
7. Moroi AJ, Watson SP. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochem Pharmacol*. 2015; 94: 186-94.
8. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 454-62.
9. Guidetti GF, Canobbio I, Torti M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Adv Biol Regul*. 2015; 59:36-52.
10. Hartwig JH. The platelet cytoskeleton. *Platelets*, 3rd edn, Michelson A 2013, p: 145-168. Academic Press, Cambridge.
11. Polgar J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood*. 2002; 100: 1081-3.
12. Ren Q, Wimmer C, Chicka MC, Ye S, Ren Y, Hughson FM, Whiteheart SW. Munc13-4 is a limiting factor in the pathway required for platelet granule release and hemostasis. *Blood*. 2010; 116: 869-77.
13. Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H. Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature*. 1980; 287: 863-5.
14. Quetglas S, Iborra C, Sasakawa N, De Haro L, Kumakura K, Sato K, Leveque C, Seagar M. Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *EMBO J*. 2002; 21: 3970-9.
15. Rink TJ, Sanchez A, Hallam TJ. Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets. *Nature*. 1983; 305: 317-19.
16. Garcia A, Kim S, Bhavaraju K, Schoenwaelder SM, Kunapuli SP. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A2 generation mediated by Gi signalling pathways. *Biochem J*. 2010; 429: 369-77.
17. Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med*. 2016; 94:13-9.
18. Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood*. 2009; 114: 2506-14.
19. Woulfe D, Jiang H, Mortensen R, Yang J, Brass LF. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J Biol Chem*. 2002; 277: 23382-90.
20. Stefanini L, Paul DS, Robledo RF y col. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. *J Clin Invest*. 2015; 125: 1419-32.
21. Jones CI, Barrett NE, Moraes LA, Gibbins JM, Jackson DE. Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function. *Methods Mol Biol*. 2012; 788: 341-66.
22. Senis YA. Protein-tyrosine phosphatases: a new frontier in platelet signal transduction. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 1800-13.
23. Hardy AR, Conley PB, Luo J, Benovic JL, Poole AW, Mundell SJ. P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood*. 2005; 105: 3552-60.
24. Dunster JL, Mazet F, Fry MJ, Gibbins JM, Tindall MJ. Regulation of early steps of GPVI signal transduction by phosphatases: a systems biology approach. *PLoS Comput Biol*. 2015; 11: e1004589.
25. Laurent PA, Severin S, Gratacap MP, Payrastra B. Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1. *Adv Biol Regul*. 2014; 54: 162-74.
26. Molino M, Bainton DF, Hoxie JA, Coughlin SR, Brass LF. Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J Biol Chem*. 1997; 272: 6011-17.
27. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*. 2017; 6:1-12.
28. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J y col. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 2013; 121:1875-85.
29. Welsh JD, Stalker TJ, Voronov R y col. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets. *Blood*. 2014; 124:1808-15.