

## LA PRESENCIA DEL RECEPTOR DEL TXA<sub>2</sub> EN LOS RAFTS LIPÍDICOS DE LAS PLAQUETAS ES NECESARIA PARA LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR TXA<sub>2</sub>

A. Moscardó<sup>1</sup>, J. Vallés<sup>1</sup>, B. Cortina<sup>1</sup>, A. Latorre<sup>1</sup>, I. Madrid<sup>2</sup>, M.T. Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Hemostasia, Trombosis, Aterosclerosis y Biología Vascular. Centro de Investigación. <sup>2</sup>Unidad de Cuidados Intensivos. Hospital Universitario La Fe. Valencia

**Introducción:** El tromboxano A<sub>2</sub> (TX) sintetizado por las plaquetas activadas juega un importante papel en la fisiopatología de la trombogénesis, reforzando la activación de las plaquetas que lo producen y promoviendo el reclutamiento plaquetario al trombo, al actuar sobre su receptor específico (R-TX). Las balsas lipídicas (*rafts*) son microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol que concentran receptores y moléculas señalizadoras y tienen un importante papel en la transmisión de señales en las plaquetas. Actualmente no se ha descrito la presencia del R-TX en los *rafts* de las plaquetas.

**Objetivo:** Analizar la presencia del R-TX en los *rafts* y los posibles efectos de su localización sobre la respuesta funcional y bioquímica al TX.

**Métodos:** Las plaquetas de sujetos normales se lavaron y se valoró la agregación mediante agregometría óptica, la liberación de nucleótidos de adenina por HPLC, los movimientos de calcio por fluorimetría y la activación plaquetaria (P-selectina y PAC-1) mediante citometría de flujo. El aislamiento de los *rafts* se realizó por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de lisados plaquetarios, analizando la presencia de proteínas por inmunodetección, e identificando los *rafts* por la presencia positiva de CD36. El papel funcional de los *rafts* se estudió deshaciéndolos por incubación de las plaquetas con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD).

**Resultados:** El aislamiento de los *rafts* mediante ultracentrifugación permitió detectar en la fracción correspondiente a los *rafts* (CD36+) un porcentaje importante (38%) del R-TX determinado por densitometrado. El tratamiento con M $\beta$ CD redujo fuertemente la presencia tanto de CD36 como del R-TX en las fracciones correspondientes a los *rafts*. Mediante microscopía confocal, empleando toxina colérica-Alexa488 como marcador de los *rafts*, confirmamos la colocalización del R-TX en los *rafts*. La agregación plaquetaria inducida por los análogos del TX U46619 (1  $\mu$ M) o IBOP (10 nM) resultó fuertemente reducida (>85%) por el tratamiento previo con M $\beta$ CD. También se redujo drásticamente la liberación de nucleótidos (-70%) y la exposición de P-selectina, indicando la participación de los *rafts* en el proceso de liberación de gránulos densos y a dependiente del R-TX. Además se redujeron los movimientos de calcio (-60%) y la activación de la integrina IIb/IIIa, implicando a los *rafts* en la transmisión de señales mediada por el R-TX.

**Conclusión:** Los resultados demuestran, por primera vez, la presencia del R-TX en los *rafts* de las plaquetas, y la importancia bioquímica y funcional de su localización en estos microdominios de membrana en la respuesta plaquetaria al TX.

FSI07/0463. RENEVASRD06/0026