

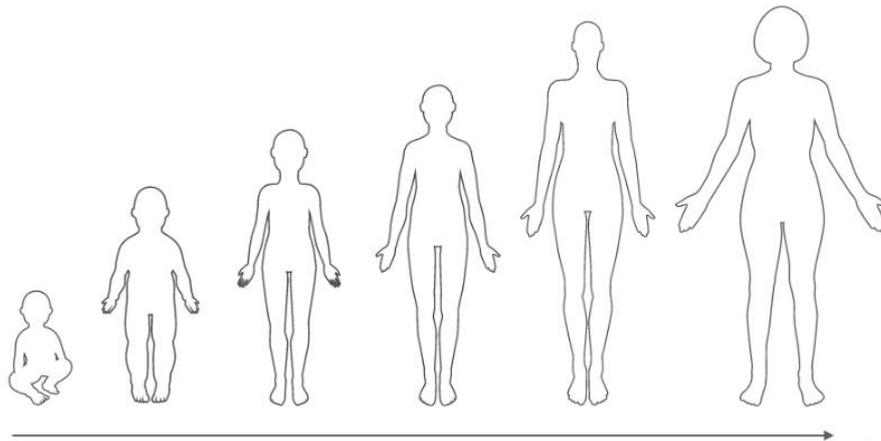


Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

## MÁSTER EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

### PRODUCCIÓN Y FUNCIÓN PLAQUETARIA DESDE NEONATOS A ADULTOS



PATRICIA VILLAR FERNÁNDEZ

Curso 2021/2022

Dpto. de Morfología y Biología celular

Laboratorio de Investigación en Plaquetas: biología, patología y aplicaciones terapéuticas

TRABAJO FIN DE MÁSTER

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1	PLAQUETAS.....	1
1.2	DIFERENCIAS ENTRE LAS PLAQUETAS DE ADULTOS Y LAS PLAQUETAS DE NEONATOS .....	3
1.2.1	<i>Diferencias en la producción plaquetaria</i> .....	3
1.2.2	<i>Diferencias en la función plaquetaria</i> .....	6
1.3	TRANSFUSIONES DE PLAQUETAS EN NEONATOS .....	7
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
3.1	MUESTRAS .....	9
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	9
3.3	ENSAYO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA .....	10
3.4	INMUNOFENOTIPADO DE LAS PLAQUETAS.....	11
3.5	OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	13
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
<b>4</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PREVIA AL ESTUDIO</b> .....	<b>14</b>
4.1.1	<i>Protocolo de obtención de Plasma Rico en Plaquetas</i> .....	14
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
5.1	DIFERENCIAS EN LOS MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS PLAQUETAS DE NEONATOS FRENTE A LAS PLAQUETAS ADULTAS.....	16
5.2	DIFERENCIAS EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE NEONATOS FRENTE A LAS PLAQUETAS ADULTAS.....	19
5.3	AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN TUBOS DE CITRATO FRENTE A EDTA .....	20
5.4	DIFERENCIAS EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE PLAQUETAS ADULTAS (CITRATO) .....	21
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>GP</b>	Glicoproteínas
<b>MK</b>	Megacariocito
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PMA</b>	Forbol Miristato Acetato
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino
<b>PRP</b>	Plasma Rico en Plaquetas
<b>TPO</b>	Trombopoyetina
<b>VWF</b>	Factor de von Willebrand, del inglés <i>von Willebrand factor</i>

## **RESUMEN**

Las plaquetas son los componentes de la sangre encargados de mantener la hemostasia corporal, además de desempeñar papeles relevantes en el sistema inmune y en patologías como el cáncer. Durante mucho tiempo se pensó que las plaquetas son iguales en todas las edades. Hallazgos recientes sugieren que las plaquetas de los recién nacidos tienen un perfil funcional diferente en comparación con las plaquetas de los adultos. Sin embargo, no se saben más detalles. Este hecho tiene implicaciones importantes en el manejo de los pacientes pediátricos ya que hoy en día se desconocen los rangos normales de función plaquetaria según la edad. Un mayor conocimiento del estado funcional de las plaquetas durante el desarrollo del individuo puede ayudar a un mejor manejo de patologías de la hemostasia o a minimizar la aparición de eventos adversos tras la transfusión de plaquetas, en edades tempranas. En este trabajo se ha estudiado la función plaquetaria de neonatos a adultos con el fin de comprender el proceso durante el desarrollo. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la agregación plaquetaria con colágeno y diferencias en la expresión de algunos marcadores, siendo significativas para los marcadores CD49B, GPVI, GPA y MPL. Los resultados obtenidos muestran, por lo tanto, la existencia de diferencias funcionales entre las plaquetas de adultos y las plaquetas de neonatos.

**Palabras clave:** plaquetas, agregación, grupos etarios, citometría

## **ABSTRACT**

Platelets are the blood components in charge of maintaining the body hemostasis, in addition to playing relevant roles in the immune system and in pathologies such as cancer. For a long time, it was thought that platelets were the same at all ages. Recent findings suggest that newborn platelets have a different functional profile compared to adult ones. However, further details are unknown. This fact has important implications in the management of pediatric patients since the normal ranges of platelet function based on age are currently unknown. A better knowledge of the functional profile of platelets depending on the age of the individual may lead to an optimized management of hemostasis related pathologies or to minimize the occurrence of adverse events upon platelet transfusion, in the early ages. In this work, we study platelet function from neonates to adults in order to understand the process during development. Results showed significant differences in platelet aggregation with collagen and differences in the expression of some markers, being significant for the CD49B, GPVI, GPA and MPL. These results show functional differences between adult and neonatal platelets.

**Keywords:** platelets, aggregation, age groups, cytometry

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Plaquetas

Tras los eritrocitos, las plaquetas son el componente sanguíneo más abundante: la concentración normal en sangre puede variar desde 150.000 a 400.000 plaquetas por microlitro. Una vez liberadas de su precursor megacariocítico, entran en el torrente sanguíneo, donde permanecen de 7 a 10 días (Koupenova *et al.*, 2018). Las plaquetas carecen de núcleo y presentan una morfología discoidal, de aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su función principal es la regulación de la hemostasia, aunque también desempeñan papeles relevantes en la angiogénesis y en la inmunidad innata y adaptativa (Thon & Italiano, 2012), además de estar implicadas en diversas patologías como la trombosis o el cáncer.

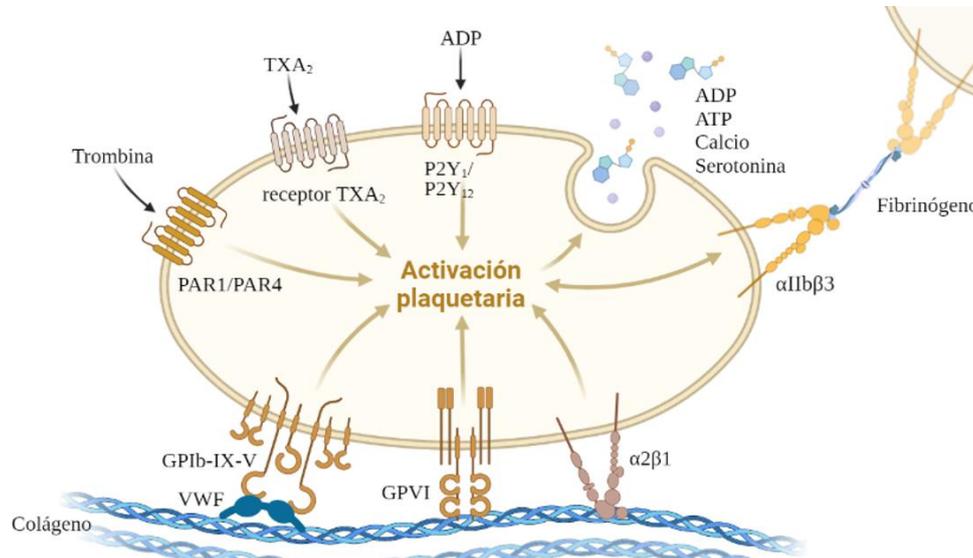
Pese a no tener núcleo, contienen proteínas empaquetadas y varias formas de ARN de sus células precursoras. A pesar de la aparente sencillez de las plaquetas, se trata de células complejas que contienen 3 tipos distintos de gránulos: gránulos  $\alpha$ , gránulos densos o  $\delta$  y lisosomas. Los gránulos  $\alpha$  son los más abundantes, contienen diversas proteínas, citocinas y factores de crecimiento fundamentales para el funcionamiento normal de las plaquetas. Los gránulos  $\delta$  albergan moléculas como el ADP, la histamina y el calcio, entre otras, que son necesarias para mantener la hemostasia. Por último, los lisosomas presentes en las plaquetas guardan en su interior enzimas hidrolíticas que degradan a las glicoproteínas, glicolípidos y glucosaminoglucanos (Morrell *et al.*, 2014).

Las plaquetas, que se encuentran en toda la vasculatura, responden a las señales del endotelio, las células circulantes u otros componentes de la sangre. En condiciones normales las plaquetas no establecen interacciones significativas con el endotelio intacto debido a múltiples mecanismos, entre los que destacan las ectonucleotidasas que degradan ATP y ADP, la trombomodulina, cuya función es degradar la trombina, y la producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (Versteeg *et al.*, 2013). Estos últimos impiden la activación plaquetaria, así como la adhesión, formación de filopodios y lamelipodios, secreción y agregación. Sin embargo, ante una lesión en el endotelio, la matriz extracelular subendotelial queda expuesta, permitiendo la adhesión plaquetaria con el objetivo de detener la hemorragia y promover la reparación del endotelio dañado. Este proceso se puede dividir en tres etapas (Rubenstein & Yin, 2018):

1. **Adhesión:** las plaquetas se adhieren al vaso sanguíneo dañado. Este proceso está mediado a través de interacciones ligando/receptor:
  - a. La unión del factor de von Willebrand (VWF) a la glicoproteína Ib (GPIb) inicia el reclutamiento plaquetario a la zona de la lesión.
  - b. El receptor GPVI interacciona con el colágeno fibrilar y la integrina  $\beta 1$  con la laminina, colágeno y fibronectina, permitiendo la adhesión firme de las plaquetas a la matriz extracelular expuesta.
2. **Activación:** las plaquetas proporcionan los factores necesarios en el proceso de coagulación. Tras la adhesión plaquetaria se activan distintas vías de señalización intracelular que resultan en un aumento de la concentración de calcio intracelular:
  - a. La fosfatidilserina, cargada negativamente, se transloca de la cara interna de la membrana plasmática de las plaquetas a la externa. Esto permite la unión de factores de coagulación.
  - b. La secreción del contenido de los gránulos  $\alpha$  y  $\delta$  tiene como consecuencia la liberación de ADP, calcio, serotonina, factores de coagulación V y VIII y fibrinógeno. Esto facilita la amplificación de la activación plaquetaria (a plaquetas circundantes), además de proporcionar a nivel local más factores de coagulación, junto con la descarga de factores de regeneración tisular, y reclutamiento de otras células de la sangre al lugar de lesión.
  - c. La integrina GPIIb/IIIa presente en las plaquetas cambia su conformación a un estado de mayor afinidad para la unión de fibrinógeno principalmente.
  - d. Se genera tromboxano A<sub>2</sub> a través del metabolismo del ácido araquidónico, que también participa en la amplificación de la señal de activación.
  - e. Se reorganiza el citoesqueleto de las plaquetas para aumentar su superficie de contacto (Haley *et al.*, 2014).
3. **Agregación:** las plaquetas se adhieren unas a otras formando un tapón. Un paso fundamental en la etapa de agregación es la conversión del receptor GPIIb/IIIa en su conformación de alta afinidad por el fibrinógeno, VWF y fibronectina. Al final de esta etapa las plaquetas se han agregado formando un tapón y dando fin a la hemostasia primaria (Wei *et al.*, 2009).

Todo esto es posible gracias al gran número de receptores presentes en la superficie plaquetaria. Estos receptores incluyen aquellos implicados en su inhibición, como el

receptor de prostaciclina IP, y los implicados en su activación, por ejemplo, glicoproteínas específicas de las plaquetas (GP) como la GPIb $\alpha$  que pertenece al complejo GPIb-IX-V, al cual se une el VWF (van der Meijden & Heemskerk, 2019) (**Figura 1**).



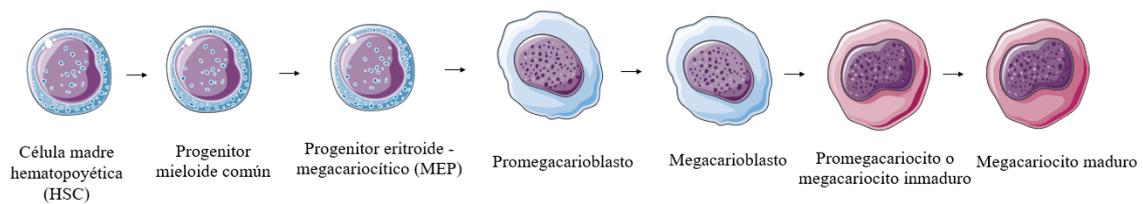
*Figura 1: Receptores implicados en la activación, adhesión y agregación plaquetaria. Imagen creada en Biorender.com*

## 1.2 Diferencias entre las plaquetas de adultos y las plaquetas de neonatos

### 1.2.1 Diferencias en la producción plaquetaria

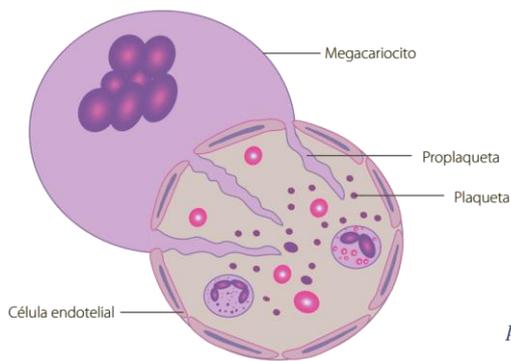
Las plaquetas se forman a partir de los megacariocitos (MK). Durante su maduración los MKs aumentan de tamaño, producen los gránulos específicos de plaquetas, expanden su contenido en proteínas del citoesqueleto y desarrollan un complejo de invaginaciones de la membrana plasmática. Los MKs derivan de células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés “*Hematopoietic Stem Cells*”) residentes principalmente en la médula ósea en el individuo adulto, aunque durante el desarrollo la producción hematopoyética tiene lugar en el saco vitelino, hígado y bazo fetal (Morita *et al.*, 2011). Al proceso de formación de MKs a partir de las HSCs se le conoce como **megacariopoyesis** (Machlus & Italiano, 2013) (**Figura 2**). La célula madre hematopoyética da lugar a un progenitor mieloide común que se diferencia a un progenitor eritroide-megacariocítico (MEP, del inglés, “*Megakaryocyte-Erythroid Progenitor*”) que es bipotente. Estos progenitores bipotentes se dividen para dar lugar a los promegacarioblastos, células diploides (2N). El paso de promegacarioblasto a megacarioblasto se produce porque estas células cambian del proceso mitótico al endomitótico (Yu & Cantor, 2012). La endomitosis consiste en la

replicación del ADN sin división celular y, en el caso de formación de MKs, sin división nuclear (Bluteau *et al.*, 2009). El siguiente paso de la megacariopoyesis consiste en la diferenciación del megacarioblasto a promegacariocito o megacariocito inmaduro, caracterizado por poseer un núcleo arriñonado con una ploidía variable (de los 4N a los 8N) y un tamaño que puede alcanzar los 50  $\mu\text{m}$ . Por último, el promegacariocito da lugar al MK maduro, con un tamaño que puede variar entre los 50 y 150  $\mu\text{m}$  y un núcleo multilobulado con una ploidía que va de los 4N a los 64N, llegando incluso a alcanzar los 128N en condiciones de una alta demanda de plaquetas (González Villalva *et al.*, 2019).



*Figura 2: Etapas de la megacariopoyesis. La célula madre hematopoyética (HSC) da origen al progenitor mieloide común y este a su vez origina el progenitor eritroide-megacariocítico (MEP). Posteriormente se diferencia a promegacarioblasto que dará lugar al megacarioblasto. Este megacarioblasto se diferenciará a promegacariocito y por último al MK maduro. Imagen creada en smart.servier.com*

Una vez que se han formado los MKs tiene lugar la **trombopoyesis**. La trombopoyesis es el proceso mediante el cual se producen las plaquetas. Incluye los últimos eventos de la maduración de los MKs, los cuales inician la formación de proplaquetas (prolongaciones pseudopodiales) y la liberación de las plaquetas directamente al torrente sanguíneo. La formación de proplaquetas comienza en un polo del MK, con la reorganización del citoesqueleto, concretamente con la reorganización de los filamentos de actina, aunque la extensión de los microtúbulos es el proceso esencial (Schulze & Shivdasani, 2005). Los microtúbulos además de participar en la elongación de las proplaquetas cumplen una segunda función, transportan los orgánulos y gránulos a los extremos de las proplaquetas y participan en el ensamblaje de las plaquetas. Estas prolongaciones pseudopodiales penetran a través de las discontinuidades de los sinusoides de la médula ósea. Una vez que han alcanzado el torrente sanguíneo, van desprendiendo fragmentos de las mismas, que por un proceso de fisión por rotación en circulación dan lugar a plaquetas maduras (Machlus & Italiano, 2013)(**Figura 3**).



**Figura 3: Esquema de la trombopoyesis.** Se observa un MK extendiendo sus proplaquetas hacia el interior de un sinusoides. El flujo sanguíneo ayuda a desprender a las plaquetas de las proplaquetas y terminar su liberación a la circulación. Imagen extraída de González-Villalva et al., 2019.

La trombopoyetina (TPO) es el principal regulador de la megacariopoyesis y la trombopoyesis. La TPO actúa temprano en el compromiso del linaje megacariocítico para promover principalmente la proliferación de progenitores de MKs. También induce el aumento de la ploidía de los MKs. Sin embargo, se ha visto que, *in vitro*, la TPO no promueve la formación de proplaquetas en los MKs lo cual lleva a pensar que hay más factores involucrados en la diferenciación terminal de MKs, tampoco altera la morfología de las plaquetas ni su capacidad para activarse (de Graaf & Metcalf, 2011).

En resumen, el proceso de producción plaquetaria se divide en cuatro fases principales:

1. Producción de factores trombopoyéticos, principalmente TPO.
2. Proliferación de los progenitores megacariocíticos.
3. Maduración de los MKs.
4. Producción y liberación de las plaquetas a circulación.

Estos cuatro pasos son esencialmente los mismos en adultos y en neonatos, pero existen ciertas diferencias. Los progenitores de los MKs presentes en los neonatos proliferan a un mayor ritmo que los progenitores de los adultos. Sin embargo, los MKs de los recién nacidos son más pequeños y tienen una menor ploidía (número de juegos completos de cromosomas en una célula) que los de los adultos, en consecuencia, producen un menor número de plaquetas por célula (Sola-Visner, 2012). Como se mencionó anteriormente, la TPO es una hormona clave en el proceso de diferenciación de los MKs. En comparación con los adultos la concentración de TPO en los recién nacidos es superior, lo que da lugar a grandes colonias megacariocíticas (Esiaba *et al.*, 2019) (Lorenz V *et al.*, 2021).

### 1.2.2 Diferencias en la función plaquetaria

El sistema hemostático neonatal difiere del adulto. Actualmente, la plaqueta neonatal se considera hiporreactiva en comparación con la plaqueta de un adulto a pesar de que los recién nacidos tienen un mecanismo de hemostasia primaria más eficiente (*Israels S. J. et al.*, 2003). Cuando se somete sangre total de neonatos (tanto de cordón umbilical como periférica) a situaciones de flujo similares a las presentes en los vasos sanguíneos, se observa una mayor deposición de plaquetas.

Algunas diferencias observadas entre las plaquetas de neonatos y adultos son:

- La expresión de P-selectina es menor en las plaquetas de neonatos comparadas con las de adultos (la expresión de P-selectina aumenta en la superficie plaquetaria tras su activación y la secreción de los gránulos  $\alpha$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto a la secreción de gránulos  $\delta$ .
- La conversión de GPIIb/IIIa a un estado de alta afinidad es un paso crítico en el desarrollo del agregado plaquetario y permite la formación de puentes de fibrinógeno entre las plaquetas adyacentes. En un estudio llevado a cabo por Sitaru *et al.* evaluaron la forma activa de GPIIb/IIIa por citometría de flujo a través de la unión de PAC-1, un anticuerpo que solo reconoce la forma activa de GPIIb/IIIa. La expresión inicial de GPIIb/IIIa resultó ser equivalente para plaquetas neonatales (del cordón y periféricas) y adultas. Sin embargo, el porcentaje de plaquetas positivas para PAC-1 después de la estimulación con trombina fue menor en las muestras neonatales en comparación con las muestras de adultos (Sitaru *et al.*, 2005).
- La respuesta a varios agonistas fisiológicos está reducida en las plaquetas de neonatos. Estudios llevados a cabo con citometría de flujo, tanto en sangre periférica como de cordón umbilical, mostraron una hiporreactividad durante el primer día de vida frente a trombina, colágeno, ADP, y U46619 (un análogo estable del tromboxano A<sub>2</sub>). Esta reactividad se vuelve normal (alcanza los niveles presentes en los adultos) entre el quinto y noveno día de vida (Del Vecchio *et al.*, 2015).

Las diferencias observadas entre ambos tipos de plaquetas parecen deberse a alteraciones en la movilización de calcio y en la señalización intracelular. A pesar de que los niveles de calcio basales son equivalentes en ambos tipos de plaquetas se ha visto que, tras una

activación con colágeno o trombina, la liberación de calcio intracelular es menor en las procedentes de muestras de neonatos, probablemente debido a una deficiencia en la producción de IP3 y su interacción con su receptor en el sistema tubular denso (reservorio de calcio) (Gelman *et al.*, 1996). Además, se encontró que la señalización de la proteína G estaba disminuida en las plaquetas de los recién nacidos en comparación con las plaquetas adultas, lo que puede proporcionar un mecanismo que explique la hiporreactividad observada en las plaquetas neonatales (Israels *et al.*, 1999).

Como nota importante, todos estos estudios se realizaron casi en su totalidad con sangre de cordón umbilical, excepto el estudio donde examinan la función plaquetaria al quinto y noveno día tras el parto.

### **1.3 Transfusiones de plaquetas en neonatos**

Muchos de los bebés nacidos de forma prematura presentan trombocitopenia (bajo recuento plaquetario). Dentro de los más prematuros el riesgo de hemorragia aumenta. Aproximadamente un 30% de los recién nacidos con un peso de menos de 1500 gramos desarrollan hemorragia intracraneal, normalmente durante la primera semana de vida (Stoll *et al.*, 2010). Debido a las altas tasas de trombocitopenia y sangrado presentes en esta población, los bebés prematuros reciben a menudo transfusiones de plaquetas, en ocasiones de forma profiláctica (Sola-Visner, 2019). Hoy en día el concentrado plaquetario procede de donantes adultos lo que puede tener consecuencias perjudiciales, como el desarrollo de una lesión pulmonar aguda producida por transfusión o TRALI.

Usando el sistema "*platelet function analyzer*" (PFA)-100 se vio que los recién nacidos sanos presentan tiempos de sangrado menores y velocidades de taponamiento mayores en comparación con los adultos a pesar de su hiporreactividad. Esto plantea la hipótesis de que la hiporreactividad de las plaquetas neonatales se encuentra en equilibrio con un estado de "hipercoagulación" de la sangre de los recién nacidos (Sola-Visner & Bercovitz, 2016). Este equilibrio puede verse alterado cuando se realiza la trasfusión con plaquetas adultas "hiperreactivas", pudiendo dar lugar a complicaciones trombóticas (Margraf *et al.*, 2019).

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Las plaquetas de los recién nacidos tienen respuestas más bajas al colágeno y, por lo tanto, se las ha considerado hiporreactivas. Sin embargo, esta noción no es del todo correcta, ya que su respuesta a los estímulos mecánicos aumenta en comparación con las plaquetas de los adultos.

La hipótesis sobre la que se basa este trabajo consiste en que, las plaquetas de neonatos y adultos presentan un perfil funcional adaptado a un momento y unas necesidades específicas (parto, dentición ...), por lo tanto son diferentes. Estas diferencias pueden ser la razón de los eventos adversos que se dan en neonatos, cuando requieren transfusión.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster consiste en aportar nuevo conocimiento esencial en cuanto a la función y producción de plaquetas de los recién nacidos, e intentar determinar el momento de transición al perfil funcional adulto.

Los objetivos específicos son:

1. Obtener, a través de la caracterización de la función plaquetaria a lo largo del desarrollo, de neonatos a adultos, una referencia de rangos normales en diferentes grupos etarios de las respuestas de agregación plaquetaria a diferentes estímulos.
2. Caracterizar las diferencias fenotípicas (en cuanto a la expresión de receptores de membrana) entre las plaquetas de los distintos grupos etarios.

### **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Muestras**

Este estudio forma parte del proyecto PEDIATHROMB del Grupo de Investigación en Plaquetas, el cual obtuvo la aprobación por parte del Comité de Ética del Hospital Universitario Central de Asturias (Nº 2021/522). El estudio se lleva a cabo de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki. El proyecto PEDIATHROMB cumple con los principios consagrados en el Convenio del Consejo de Europa sobre derechos humanos y biomedicina, conocido como Convenio de Bioética (Oviedo). El estudio se diseñó para cumplir también con la Guía de Buenas Prácticas Clínicas del Tema E6 de la ICH, tal como se implementó en Europa (directriz CPMP/ICH/135/95) y se incorporaron en las respectivas leyes nacionales en consecuencia. Las muestras de sangre fueron obtenidas de donantes sanos tras consentimiento informado, o bien de muestras remanentes que de otro modo serían desechadas. Todas las muestras fueron anonimizadas. Además, se prepararon hojas de información al paciente y consentimiento informado dirigidas según grupo etario, y se elaboró un infograma para niños mayores de 12 años (**ANEXO I**), con el objetivo de hacer más visual y facilitar la comprensión del proyecto. Finalmente, y al contar el estudio con menores de edad, se aprovecharon las muestras tomadas para la medición del hemograma, evitando así causarles un mayor malestar. Estas muestras se toman en tubos con ácido etilendiaminotetraacético o EDTA como anticoagulante (ver nota más adelante, acerca del anticoagulante).

#### **3.2 Diseño experimental**

Los grupos etarios seleccionados para este estudio incluyen sangre de donantes de: cordón umbilical; neonatos; 3 meses; 6 meses; 9 meses; 1 año; 3 años; 5 años; 7 años; 9 años; 12 años; 15 años; 18 años; 25 años; 45 años; 65 años; 85 años. En el caso de los adultos con un margen de  $\pm 3$  años. Este estudio se divide en varias fases. En todas ellas se realiza el marcaje de superficie de plaquetas. En la primera se estudia la agregación en sangre total. A continuación, se estudia en plaquetas lavadas en presencia de un porcentaje mínimo de plasma y, por último, se estudia, en cultivo celular, la diferenciación megacariocítica (**Figura 4**).

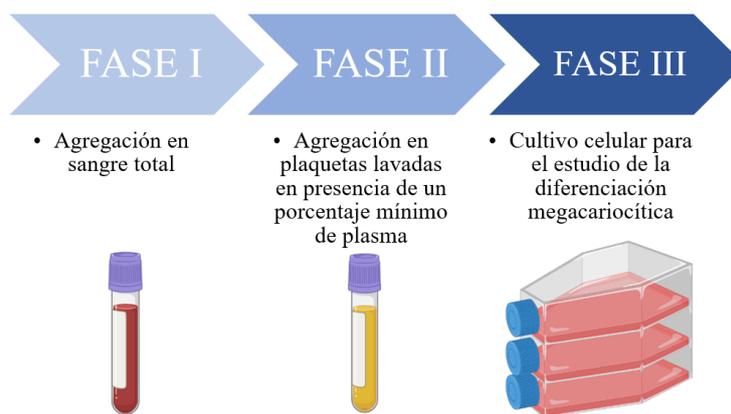


Figura 4: Esquema del diseño experimental seguido en el proyecto PEDIATHROMB.

Para ello se tuvieron que optimizar la gran mayoría de los protocolos para adaptarlos a volúmenes pequeños, o para anticoagulantes antes no utilizados en diferentes pruebas.

### 3.3 Ensayo de agregación plaquetaria

Con el ensayo de agregación plaquetaria se pretendió conocer el estado plaquetario frente a diferentes estímulos. Las agregaciones se llevaron a cabo en el PL-12 (SINNOWA Co, Nanjing, China). Esta máquina mide la función plaquetaria mediante el método de conteo secuencial de plaquetas a través de tecnología de impedancia, registrando el número de plaquetas libres en la muestra antes y después de añadir el agonista con un intervalo temporal fijo durante todo el proceso. La agregación plaquetaria es una variable inversamente proporcional al conteo de plaquetas en la muestra: el descenso en el conteo de plaquetas indica un aumento en la agregación plaquetaria. El volumen de sangre necesario para llevar a cabo las agregaciones con el PL-12 son 300  $\mu$ l. En la actualidad se utilizan los tubos de citrato ya que éste actúa como un anticoagulante reversible y por lo tanto son idóneos para los ensayos de coagulación realizados en sangre total. Debido a las condiciones del estudio las muestras se recibieron en tubos de EDTA. La concentración de EDTA presente en los tubos está calculada para que haya 1,8 mg por ml de sangre (llenándose el tubo). Este anticoagulante actúa como un agente quelante del calcio por lo que, para contrarrestar el efecto del EDTA, se añadieron 4,3  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  (200 mM) tras la primera medición del PL-12. Esta máquina proporciona 8 medidas del número de plaquetas de cada muestra, tomando las dos primeras antes de añadir el agonista. Con estas dos primeras mediciones se realiza una media, cuyo valor se usa como punto de partida para calcular los porcentajes de agregación en cada tiempo (entre ellos el porcentaje de agregación máximo [MAR]), y permite calcular el valor para cada reacción utilizando el Área Bajo la Curva.

La variabilidad entre cada donante de la función plaquetaria y las respuestas ante los diferentes estímulos es muy amplia. Por eso, para evaluar correctamente los niveles de agregación se cuantificó previamente, en cada donante, la respuesta de las plaquetas sin agonista ya que, en plaquetas sanas en estado fisiológico normal, no se espera agregación. Posteriormente se observó la respuesta de ese donante en particular ante el agonista correspondiente. Estos estímulos consistieron en 5 agonistas; PMA (1 mg/ml), un agonista de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ; Convulxina (CVX; 6,25 ng/ $\mu\text{l}$ ) una toxina del veneno de serpiente *Crotalus durissus terrificus* que induce la activación de las plaquetas actuando como agonista del receptor GPVI; agretina A o AggA (65,8 nM), una lectina heterodimérica de tipo C procedente del veneno de serpiente (*Calloselasma rhodostoma*) la cual exhibe actividades proangiogénicas a través de la unión al receptor CLEC1B; ristocetina o RISTO (10 mg/ml), un antibiótico capaz de provocar la polimerización del VWF, que se une al receptor del VWF (complejo GPII $\alpha$ -V-IX); colágeno (1 mg/ml), el cual se une a la integrina  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ , y también a GPVI. Cada agonista activó la agregación de las plaquetas por distintas vías de señalización.

### 3.4 Inmunofenotipado de las plaquetas

Partiendo del conteo de plaquetas del hemograma correspondiente a cada muestra se calculó el volumen necesario para añadir 1.000.000 de plaquetas por reacción. Este volumen se añadió a tubos de citometría con 100  $\mu\text{l}$  de los paneles correspondientes, a excepción del tubo de la muestra sin marcar el cual contenía 100  $\mu\text{l}$  de PBS con BSA al 1%. Los paneles I, III y IV se realizaron en PBS con BSA al 1% utilizándose en todos los anticuerpos concentraciones de 1:200 excepto CD71 (1:800) y KIT (1:400). El panel II se realizó en HEPES con 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (200 mM) utilizándose en todos los anticuerpos concentraciones de 1:200 (**Tabla 1**).

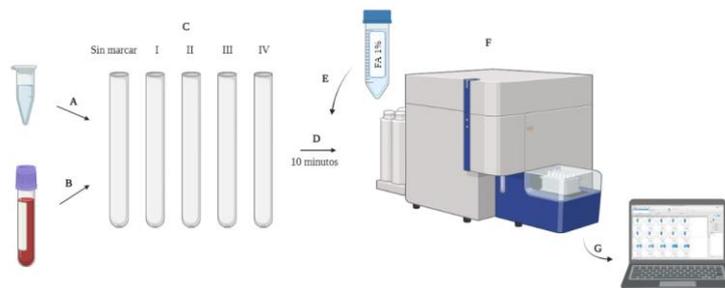
Dentro de los marcadores a estudiar se encuentran, **CD61**, una glicoproteína plaquetaria (GPIIIa), asociada concovalentemente con la cadena  $\alpha\text{IIb}$  de la integrina **CD41** (GPIIb) para formar el complejo GPIIb-IIIa (integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ), un receptor de iniciación de la activación plaquetaria. Otros receptores de iniciación son **CD49B** (GPIa), el cual se une al colágeno, **CD42B** (GPII $\alpha$ ) una glicoproteína de membrana que forma parte de la proteína de membrana GPIb la cual forma un complejo no covalente con **CD42A** (GPIX) para dar lugar al receptor para VWF. **GPVI** (receptor para el fibrinógeno) y **CLEC1B** o **CLEC2** (receptor de podoplanina) se incluyen dentro de los denominados “receptores de amplificación de la activación plaquetaria”. En la superficie de las plaquetas se expresan

además receptores presentes en precursores hematopoyéticos, como son, **CD34**, **GPA**, **MPL**, **KIT** y **CD71** además de otros receptores como **CD9** (se expresa en la superficie de las plaquetas), **anexina V** (se une a las plaquetas una vez activadas) y **CD36** (receptor *scavenger* clase B).

**Tabla 1: Anticuerpos usados en cada panel.** <sup>1</sup> BD Biosciences (San Jose, CA) <sup>2</sup> BioLegend (San Diego, CA). Se indica la concentración de aquellos anticuerpos en los que se especifica en su hoja informativa.

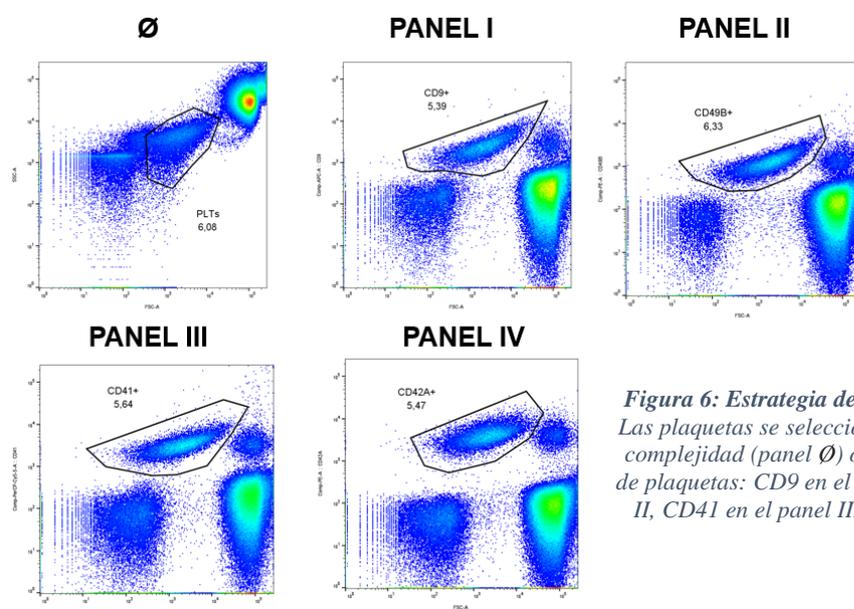
Panel I			Panel II			Panel III			Panel IV		
FITC	Mouse	Anti-Human	FITC	Anti-Human	CLEC1B	FITC	Mouse	Anti-Human	PE	Mouse	Anti-Human
CD61 <sup>1</sup> .			(CLEC2)	(clon AYP1) <sup>2</sup> .		CD34 <sup>1</sup>			CD42a <sup>1</sup>		
12,5 µg/ml			200 µg/mL								
PE	Mouse	Anti-Human	PE	Mouse	Anti-Human	CD49B <sup>1</sup>	PE	Mouse	Anti-Human	PE/Cy7	Anti-Human
Platelet GPVI (clon HY101) <sup>1</sup>							CD235 (GPA) <sup>1</sup> .			CD117 (c-Kit)	(clon
							0,2 mg/ml			104D2) <sup>2</sup> .	
										400 µg/ml	
PerCP	Anti-Human	CD42b	Alexa	Fluor	647	Anti-Human	PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5	CD41a	APC	Mouse	Anti-Human
(clon HIP1) <sup>2</sup> .			CD31 (clon WM59) <sup>2</sup> .				(clon HIP8) <sup>1</sup> .		CD36 <sup>1</sup>		
400 ng/ml			100 µg/mL				25 µg/ml				
APC	CD9 (M-L13) <sup>1</sup> .		PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5	Annexin V <sup>1</sup>			APC	Mouse	Anti-Human	APC/Cy7	Anti-Human
100 µg/mL.							CD110 (MPL)	(clon	CD71 (clon CYG4) <sup>2</sup> .		
							1.6.1) <sup>1</sup> .		100 µg/ml		
							0,2 mg/ml				

Tras añadir el volumen de sangre total correspondiente los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se fijaron las muestras con 100 µl de formaldehído al 1% (así la concentración final es de 0.5%, que es la óptima para fijar plaquetas sin alterar su integridad). Las muestras fijadas se midieron en el citómetro (FACS Aria IIu sorter) y se analizaron los resultados usando el software FlowJo versión 9.2 (Tree Star, inc) (**Figura 5**).



**Figura 5: Metodología del ensayo de inmunofenotipado plaquetario:** se añaden a cada tubo de citometría 100µl de PBS/BSA 1% o del panel de anticuerpos correspondiente a cada tubo de citometría (A). A continuación, se añade el volumen de sangre total necesario para añadir 1.000.000 de plaquetas (B). Tras una incubación de 10 minutos (D) se añaden 100µl de formaldehído al 1% (E). Tras la fijación se pasan las muestras por el citómetro (F) y se analizan los resultados (G).

La estrategia de selección (“gating”) fue la mostrada en la **Figura 6**. Las plaquetas en el panel sin marcar ( $\emptyset$ ) se seleccionaron en base a su morfología (dispersión frontal o *forward scatter* y dispersión lateral o *side scatter*). Esta selección se pasó a los diferentes paneles y en cada uno se comprobó (con marcadores específicos de plaquetas) que la población seleccionada fuese verdaderamente la correspondiente a las plaquetas.



**Figura 6: Estrategia de selección en sangre total.** Las plaquetas se seleccionan en base a su tamaño y complejidad (panel  $\emptyset$ ) o a marcadores específicos de plaquetas: CD9 en el panel I, CD49B en el panel II, CD41 en el panel III y CD42A en el panel VI.

### 3.5 Obtención de Plasma Rico en Plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) es la fracción líquida procesada a partir de sangre periférica autóloga con una concentración de plaquetas por encima de la presente en la sangre total (Everts *et al.*, 2020). Para obtener el PRP se centrifugaron los tubos, que contenían de 10 a 5 ml de sangre, a 1000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y sin freno (de esta forma se evitó que la centrífuga se detuviese bruscamente evitando la correcta separación de las fracciones sanguíneas).

La fracción superior, por encima de la interfase, es el plasma rico en plaquetas. La interfase contiene principalmente células mononucleares (y plaquetas), y la fracción por debajo de la interfase contiene principalmente células rojas y neutrófilos (granulocitos), y células más densas.

### 3.6 Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron empleando *RStudio* versión 4.1.1. El análisis se usó para comparar las plaquetas en los distintos grupos etarios estudiados. Las diferencias se analizaron mediante la prueba paramétrica de análisis de la varianza o ANOVA. El valor de significación se estableció en un  $*p \leq 0,05$  y  $**p \leq 0,01$ .

## 4 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PREVIA AL ESTUDIO

### 4.1.1 Protocolo de obtención de Plasma Rico en Plaquetas

Teniendo en cuenta que, en ocasiones, las muestras proceden de niños de muy temprana edad, no siempre es posible obtener volúmenes de sangre adecuados para trabajar cómodamente. Por ello se optimizó el protocolo de manera que se pudiese obtener el mayor volumen de PRP sin afectar a la función plaquetaria. Para ello se probaron tres protocolos (**Tabla 2**). Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente para evitar la activación plaquetaria.

*Tabla 2: Protocolos empleados en la obtención de PRP*

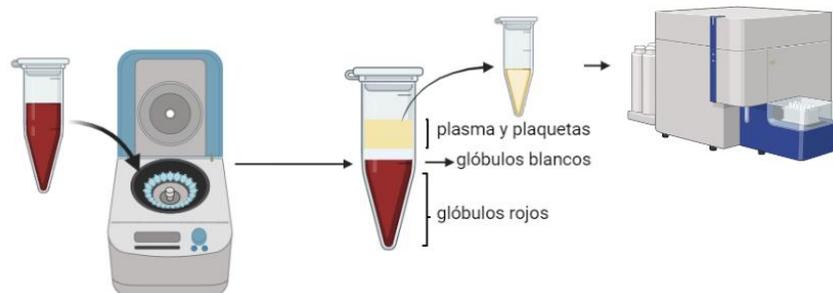
PROTOCOLO	CENTRIFUGADO
1	1000 rpm. 15 min
2	700 rpm. 25 min
3	1500 rpm. 5 min

Tras el recuento de las plaquetas determinamos que tanto el protocolo 2 como el 3 son los que permiten recuperar el mayor número de plaquetas de una muestra de sangre en un volumen mínimo de 1 ml. A continuación, se evaluó con cuál de ellos se conseguía la menor activación plaquetaria. Para ello se analizó, mediante citometría de flujo (FACS Aria IIu sorter) los niveles de expresión de P-selectina (también conocida como CD62P). La P-selectina se encuentra en las membranas de los gránulos  $\alpha$  y la activación plaquetaria por los mismos agentes que inducen su agregación también da como resultado la exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas (Fox *et al.*, 2019). Para el marcaje se usaron 20  $\mu$ l del panel de anticuerpos correspondiente. El panel se elaboró añadiendo 150 $\mu$ l de FB-Alexa Fluor<sup>TM</sup>488, 5 $\mu$ l de PE Mouse Anti-Human CD62P, 5 $\mu$ l de PerCP-Cy<sup>TM</sup> 5.5 Annexin V, 5 $\mu$ l de APC CD9 (M-L13) y 5 $\mu$ l de PE/Cy7 anti-human CD63 (clon H5C6) a 820 $\mu$ l de HEPES y 10 $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub>. Todos los anticuerpos se encontraban en concentraciones de 1:200 (**Tabla 3**).

*Tabla 3: Anticuerpos usados en cada panel. <sup>1</sup>ThermoFisher <sup>2</sup>BD Biosciences (San Jose, CA) <sup>3</sup>BioLegend (San Diego, CA). Se indica la concentración de aquellos anticuerpos en los que se especifica en su hoja informativa.*

Fibrinógeno -Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 <sup>1</sup> . 0.5 mg/mL	APC CD9 (M-L13) <sup>2</sup> . 100 $\mu$ g/mL.
PE Mouse Anti-Human CD62P <sup>2</sup>	PE/Cy7 anti-human CD63 (clon H5C6) <sup>3</sup>
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Annexin V <sup>2</sup>	

El procedimiento seguido consistió en; una vez determinado el volumen de PRP necesario para añadir 20.000.000 de plaquetas (x3 ya que se trata de tres reacciones) se completó hasta llegar a 300  $\mu$ l con una disolución tampón de HEPES (132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.4, con 5 mM de glucosa) y se añadió a un eppendorf. A continuación, se centrifugó el tubo a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo se preparó un MIX de plasma AB+. Se necesitaron 350 $\mu$ l del MIX para cada reacción, al tratarse de tres reacciones se añadieron 840 $\mu$ l de HEPES, 210 $\mu$ l de plasma AB+ (de forma que al final el MIX tenga una concentración de plasma al 20%) y 10,5  $\mu$ l de PPACK (concentración final 20  $\mu$ M), un inhibidor de trombina. Tras un periodo de incubación de 10 minutos se prepararon tres tubos eppendorf, dos de ellos con el agonista (uno de ellos con 1 $\mu$ l de TRAP6 (100  $\mu$ M) y otro con 1 $\mu$ l de PMA (100 ng/ml)), y un eppendorf vacío. Tras la centrifugación se secó el precipitado y se resuspendió con el MIX. Los tubos se pusieron en un bloque de mezcla a 37°C y 1000 rpm. A tiempo 0 se añadieron 100 $\mu$ l de muestra al eppendorf con TRAP6, tras 30 segundos otros 100  $\mu$ l al eppendorf con PMA y tras otros 30 segundos 100  $\mu$ l al eppendorf vacío. Los tubos se mantuvieron en agitación 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se sacaron 10  $\mu$ l a tres tubos de citometría que contenían 20  $\mu$ l del panel. Se dejaron incubar durante 10 minutos. Finalmente se añadieron 200  $\mu$ l de formaldehído al 0,5% en cada tubo (**Figura 7**).



*Figura 7: Esquema de obtención de PRP a partir de muestras de pequeño volumen. Imagen elaborada en BioRender.com*

Una vez analizada su expresión no se observaron diferencias relevantes (datos no mostrados) por lo que continuamos con el protocolo 3.

## 5 RESULTADOS

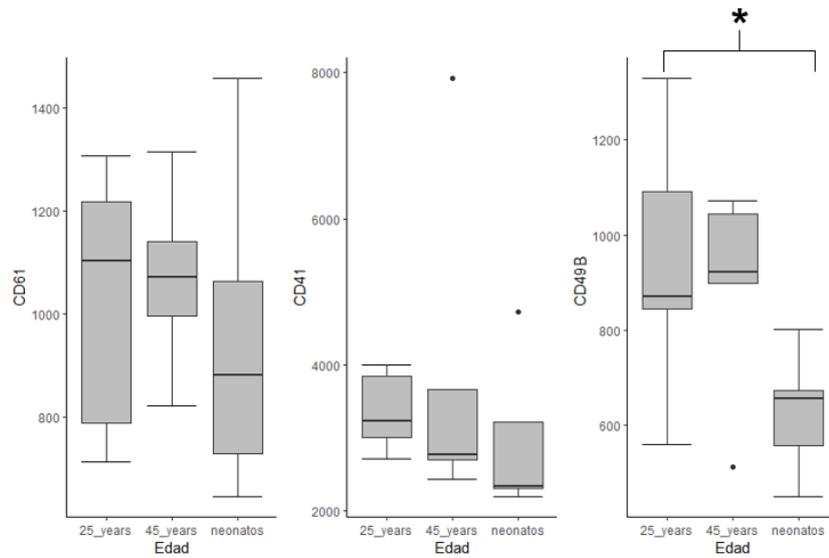
El estudio PEDIATHROMB se concibe como un estudio a largo plazo, en el que se pretende estudiar y comprender en qué momento se produce la transición de una plaqueta “neonatal” a una plaqueta adulta. Por ello se abarcan edades desde el nacimiento hasta la vejez. En este Trabajo Fin de Máster (TFM) se muestran los resultados de los grupos etarios completos hasta la fecha (neonatos, 25 y 45 años). Estos tres grupos permiten ver cómo cambia la función plaquetaria desde el momento del nacimiento, hasta la edad adulta.

### 5.1 Diferencias en los marcadores de superficie de las plaquetas de neonatos frente a las plaquetas adultas

En la literatura está descrito que las plaquetas presentes en neonatos presentan una menor respuesta a distintos agonistas, como es el caso del colágeno. Por lo que se decidió comprobar si estas diferencias pueden deberse a alteraciones en la expresión superficial de proteínas clave, es decir, receptores plaquetarios. Para ello se marcaron y se analizaron, mediante citometría de flujo, distintos marcadores. Como se citó anteriormente los marcadores estudiados fueron: CD61, CD41, CD49B, CD42B y CD42A (receptores clásicos plaquetarios); GPVI y CLEC1B (receptores considerados “no hemostáticos”, porque participan además en las funciones inmunomoduladoras de plaquetas), y otros receptores no analizados comúnmente, pero presentes en plaquetas, como CD9 (proteína presente en la superficie de las plaquetas); anexina V (que detecta la fosfatidilserina -PS- en la superficie plaquetaria tras su activación); CD36 (receptor *scavenger*); CD34, GPA, MPL, KIT y CD71 (receptores presentes en otros linajes y/o en precursores hematopoyéticos).

Los resultados mostraron un incremento en la expresión de receptores de iniciación de la activación plaquetaria (CD61, CD41 y CD49B) en los grupos de 25 y 45 años con respecto a los neonatos. Existen diferencias significativas en la expresión de CD49B entre las plaquetas de neonatos y las del grupo de 25 años (**Figura 8**). Teniendo en cuenta que CD49B (subunidad de la integrina  $\alpha\beta 1$ ) es un receptor para el colágeno, que las plaquetas de neonatos presenten niveles reducidos de este receptor en comparación apoya lo descrito en la literatura.

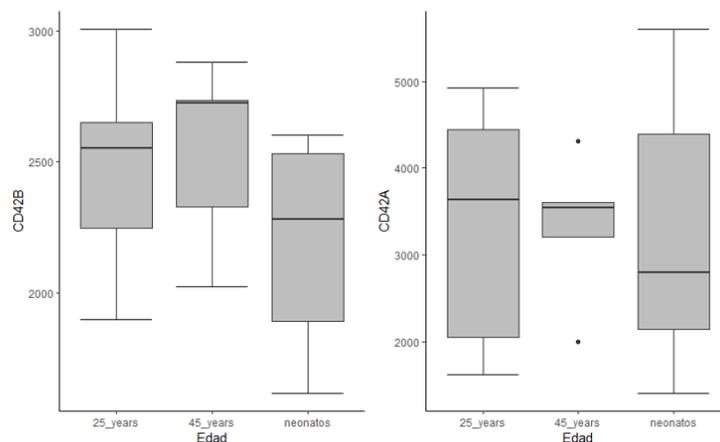
### Receptores de iniciación de la activación plaquetaria



**Figura 8:** Expresión de las moléculas de superficie CD61, CD41 y CD49B. Los resultados son mostrados como la distribución y la tendencia de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcadores correspondientes en los distintos grupos etarios: neonatos (cinco muestras), 25 años (seis muestras) y 45 años (cinco muestras). El análisis estadístico se realizó comparando las IMF entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$ .

Otro receptor de iniciación de la activación plaquetaria estudiado fue GPIb-V-IX, el cual reconoce VWF y está formado, entre otras, por las moléculas CD24B y CD42A (**Figura 9**). En este caso no se observaron diferencias significativas.

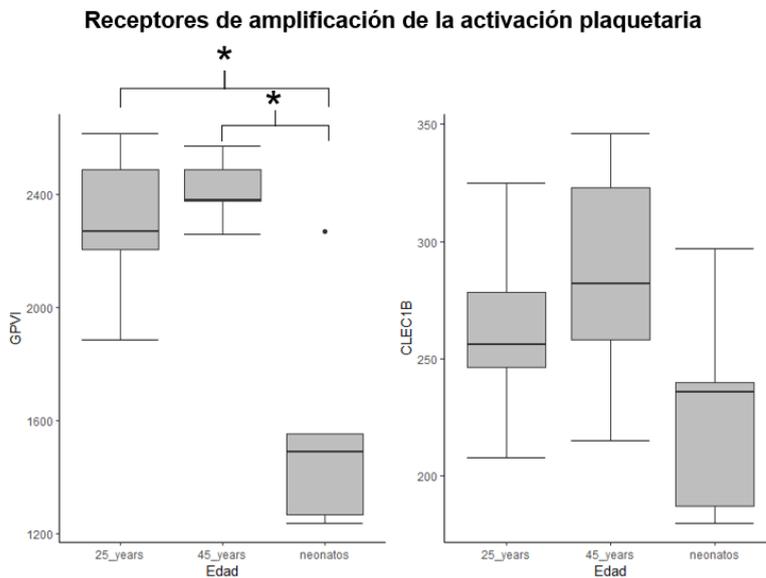
### Conforman receptor de superficie para el FWW



**Figura 9:** Expresión de las moléculas de superficie CD42B y CD42A. Los resultados son mostrados como la distribución y la tendencia de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcadores correspondientes en los distintos grupos etarios: neonatos (cinco muestras), 25 años (seis muestras) y 45 años (cinco muestras). El análisis estadístico se realizó comparando las IMF entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$ .

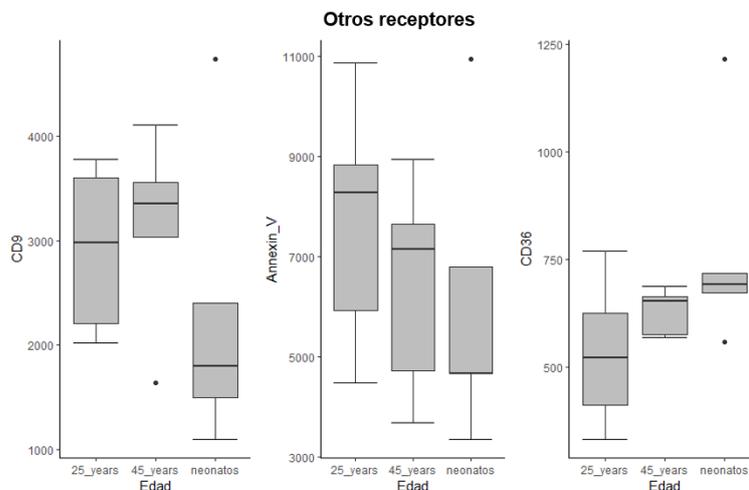
A continuación se estudiaron los receptores de amplificación de la activación plaquetaria (GPVI Y CLEC1B) los cuales desempeñan importantes papeles no hemostáticos, en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, enfermedades autoinmunes, cáncer, separación

de los vasos sanguíneos y linfáticos y desarrollo pulmonar durante la gestación. Los resultados mostraron una reducción en su expresión en neonatos, siendo significativo en el caso de GPVI entre neonatos y 25 años y entre neonatos y 45 años (**Figura 10**). GPVI también actúa como receptor de colágeno.



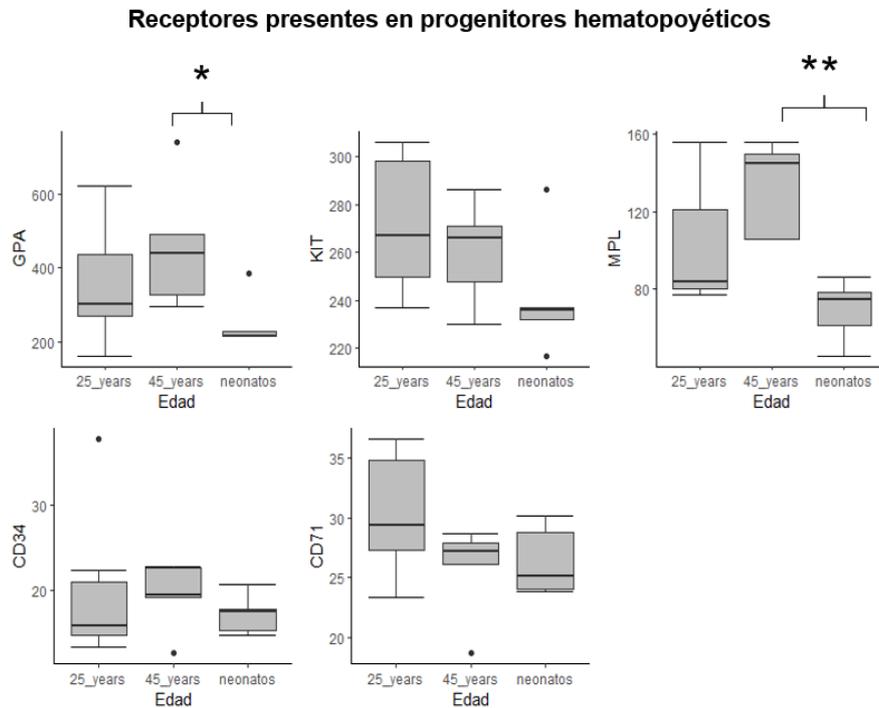
*Figura 10: Expresión de las moléculas de superficie GPVI y CLEC1B. Los resultados son mostrados como la distribución y la tendencia de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcadores correspondientes en los distintos grupos etarios: neonatos (cinco muestras), 25 años (seis muestras) y 45 años (cinco muestras). El análisis estadístico se realizó comparando las IMF entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$*

Otros receptores plaquetarios estudiados fueron CD9, anexina V y CD36 (**Figura 11**). Se observa una mayor expresión del receptor *scavenger* CD36, mientras que CD9 se expresa con tendencia a la baja en plaquetas de neonatos. Curiosamente, y apoyando el concepto de hiporreactividad de las plaquetas de neonatos, en su estado quiescente, observamos una tendencia a una menor expresión de grupos PS en las plaquetas de neonatos (menor unión de Anexina V).



*Figura 11: Expresión de las moléculas de superficie CD9, anexina V y CD36. Los resultados son mostrados como la distribución y la tendencia de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcadores correspondientes en los distintos grupos etarios: neonatos (cinco muestras), 25 años (seis muestras) y 45 años (cinco muestras). El análisis estadístico se realizó comparando las IMF entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$*

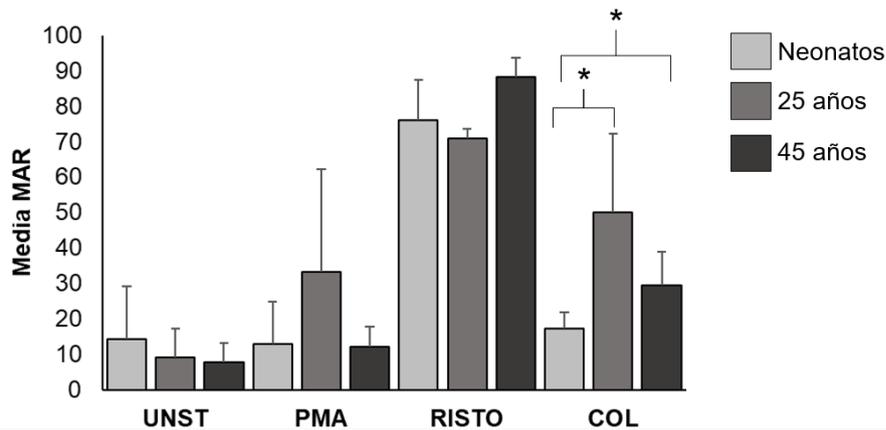
Finalmente se estudiaron receptores presentes en progenitores hematopoyéticos (**Figura 12**), con resultados similares a la mayoría de los receptores anteriormente examinados: tendencia a la baja en plaquetas de neonatos.



**Figura 12:** Expresión de las moléculas de superficie GPA, KIT, MPL, CD34 y CD71. Los resultados son mostrados como la distribución y la tendencia de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de marcadores correspondientes en los distintos grupos etarios: neonatos (cinco muestras), 25 años (seis muestras) y 45 años (cinco muestras). El análisis estadístico se realizó comparando las IMF entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$

## 5.2 Diferencias en la agregación plaquetaria de neonatos frente a las plaquetas adultas

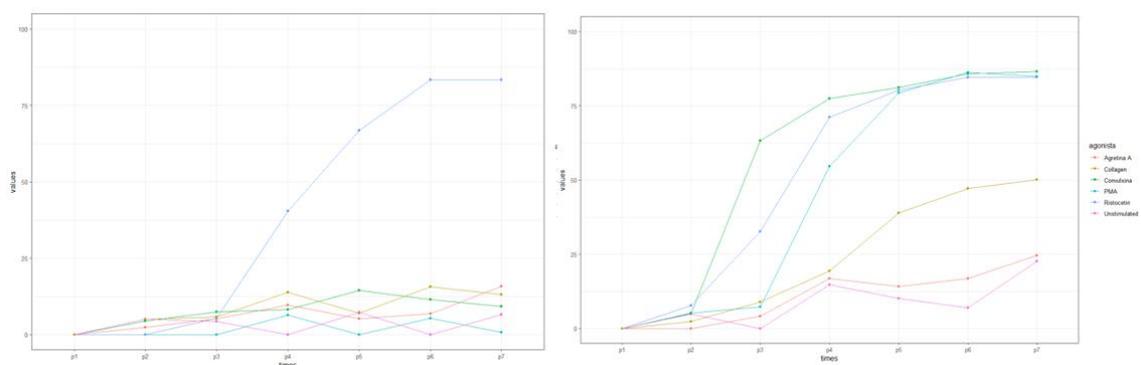
A continuación, se evaluó la agregación plaquetaria en sangre total (tubos con EDTA) siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Material y Métodos”. Debido al volumen de las muestras de sangre procedentes de neonatos no se pudieron emplear todos los agonistas pensados. Una vez obtenidas las curvas de agregación (**ANEXO II**) se calculó la tasa máxima de agregación (MAR, del inglés *maximum aggregation rate*). Tras eso se calcularon las medias de las MAR por cada grupo de edad y agonista y se realizó el análisis estadístico observándose diferencias significativas en la agregación con colágeno entre el grupo de neonatos y el de 25 y 45 (**Figura 13**).



**Figura 13: Agregación de las plaquetas en sangre total (EDTA) frente a distintos agonistas.** UNST = sin estímulo, PMA = forbol 12-miristato 13-acetato, RISTO = ristocetina, COL = colágeno. Los resultados se muestran como la media de la MAR. El análisis estadístico se realizó comparando las distintas medias entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$ .

### 5.3 Agregación plaquetaria en tubos de citrato frente a EDTA

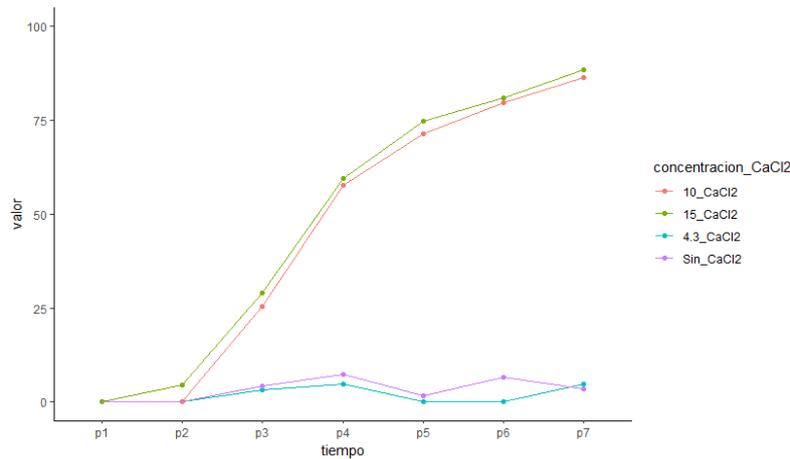
Como se puede ver en el ANEXO II existe respuesta a ristocetina en todos los pacientes sin embargo, la respuesta a los distintos agonistas es variable, desde su ausencia hasta valores de agregación por debajo de lo esperado. En un primer momento se pensó que la ausencia de respuesta podría deberse al efecto de la anestesia por lo que se tomaron las muestras antes de su aplicación. Si bien es cierto que la anestesia afecta a la agregación plaquetaria (Bozdogan *et al.*, 2005) obtener las muestras antes no solucionaba el problema. El siguiente paso fue comprobar cómo afectaba el método de extracción, tras evaluar distintos métodos determinamos que el que menos afectaba a la función plaquetaria era la extracción mediante palomilla en la flexura del brazo (**Figura 14**).



**Figura 14: Curvas de agregación correspondientes al mismo paciente tras la extracción con catéter venoso periférico al canalizar la vía periférica (izquierda) y tras la extracción con palomilla en la flexura del brazo (derecha) ante distintos agonistas.** Agretina A (naranja), colágeno (amarillo), convulxina (verde), PMA (azul claro), ristocetina (azul oscuro) y sin estímulo (rosa).

Una vez determinado el momento y el método de extracción adecuado, las agregaciones seguían sin ser las esperadas. Finalmente evaluamos el volumen de  $\text{CaCl}_2$  a añadir, ya que

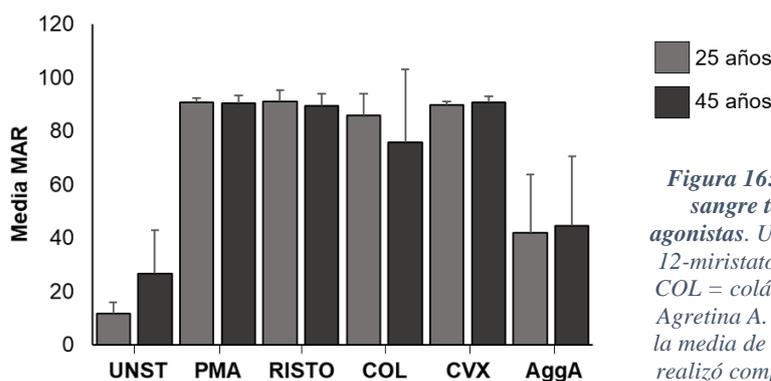
los 4,3  $\mu\text{l}$  añadidos por 300  $\mu\text{l}$  de sangre total habían sido optimizados para otros experimentos en los que la concentración de anticoagulante se ajustaba al volumen de sangre del tubo (al tratar con pacientes pediátricos los tubos no se llenan por lo que la concentración de anticoagulante es mayor y los 4,3  $\mu\text{l}$  no revierten la acción quelante). Para ello añadimos (en la misma muestra) distinto volumen de  $\text{CaCl}_2$ . Como se puede ver en la **figura 15** las mejores curvas de agregación se obtuvieron añadiendo el doble o triple de lo añadido en los experimentos.



*Figura 15: Curva de agregación correspondiente al mismo paciente tras la adición de PMA y; no añadir calcio (morado); añadir 4,3  $\mu\text{l}$  (azul); 10  $\mu\text{l}$  (naranja); 15  $\mu\text{l}$  (verde). El  $\text{CaCl}_2$  se encuentra a una concentración de 200 mM.*

#### 5.4 Diferencias en la agregación plaquetaria de plaquetas adultas (citrato)

En el caso de los voluntarios mayores de edad se extrajo además un tubo de sangre con citrato. De esta forma tenemos un “control” que nos permite ver que efectivamente las agregaciones con EDTA son correctas y equivalentes (ya que el citrato es el anticoagulante idóneo para los ensayos funcionales de plaquetas). En este caso solo se han podido comparar los grupos de 25 y 45 años pero debido a que el volumen era mayor se pudo estudiar su agregación frente a los cinco agonistas. No se observan diferencias en cuanto a los niveles de agregación (**Figura 16**).



*Figura 16: Agregación de las plaquetas en sangre total (citrato) frente a distintos agonistas. UNST = sin estímulo, PMA = forbol 12-miristato 13-acetato, RISTO = ristocetina, COL = colágeno, CVX = convulxina, AggA = Agretina A. Los resultados se muestran como la media de la MAR. El análisis estadístico se realizó comparando las distintas medias entre los tres grupos de edad. \* $p \leq 0,05$  y \*\* $p \leq 0,01$ .*

## 6 DISCUSIÓN

Las plaquetas son el componente sanguíneo encargado de mantener la hemostasia corporal, evitando el sangrado. En los últimos años a las plaquetas se les han asignado otras funciones más allá de la hemostasia, que incluyen la inmunomodulación, metástasis del cáncer y separación de vasos sanguíneos y linfáticos durante el desarrollo.

Durante mucho tiempo se pensó que las plaquetas son siempre el mismo producto final. Hallazgos recientes (Davenport & Sola-Visner, 2022) sugieren que las plaquetas de los recién nacidos tienen un perfil funcional diferente en comparación con las plaquetas de los adultos. Sin embargo, no se sabe por qué ocurre esto ni en qué momento las plaquetas transitan al perfil funcional “adulto”. Este hecho tiene implicaciones importantes en el manejo de los pacientes pediátricos que presentan riesgos hemorrágicos/trombóticos. Actualmente, no existen rangos normales de función plaquetaria basados en la edad a los que puedan referirse los médicos de los servicios de diagnóstico.

En este trabajo estudiamos la función plaquetaria en sangre total de neonatos a adultos con el fin de corroborar nuestra hipótesis sobre que el perfil funcional de las plaquetas cambia durante el proceso de desarrollo.

Es especialmente interesante resaltar que, ante un estímulo con ristocetina (antibiótico que permite la aglutinación plaquetaria gracias a la unión del factor de von Willebrand a la glicoproteína Ib del receptor de plaquetas GPIb) siempre se produzca una correcta agregación plaquetaria, independientemente del método de extracción, suministro de anestesia o concentración de calcio añadida (condiciones que sí afectan al resto de agonistas). Esto se debe a que la agregación plaquetaria a través de la vía de señalización del VWF es más “mecánica” en comparación al resto, que son más sensibles a la concentración de calcio y otros compuestos. Además nuestros resultados muestran que no existen diferencias en la expresión de receptores para el VWF entre los distintos grupos etarios, lo que explica por qué no hay variaciones en los niveles de agregación plaquetaria ante un estímulo con ristocetina en los distintos grupos estudiados.

Nuestros resultados muestran diferencias significativas en cuanto a la respuesta frente al colágeno, siendo las plaquetas de los neonatos menos sensibles. Esto concuerda con lo descrito en la literatura (Herken *et al.*, 2021). Esta menor respuesta de agregación con colágeno puede deberse a que, como muestra la **figura 10** hay una menor expresión en membrana de los receptores para el colágeno: GPVI y CD49B (GPIa). Estos resultados

son de gran relevancia en la clínica puesto que, ante una transfusión las plaquetas adultas podrían comportarse de forma hiperreactiva desencadenando patologías como la lesión pulmonar aguda producida por transfusión o TRALI.

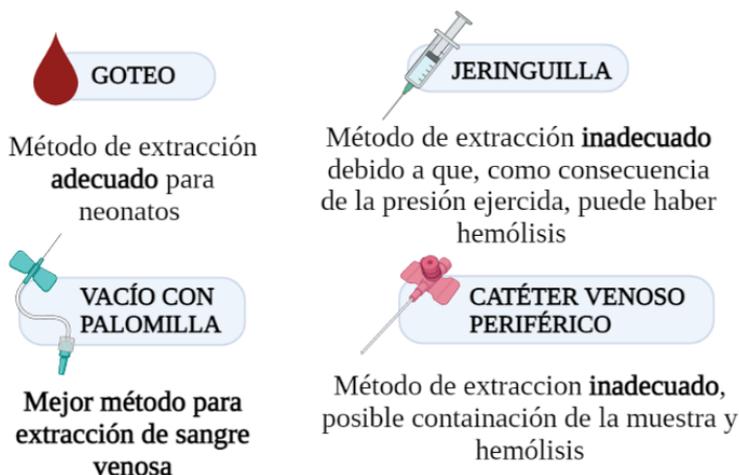
Nuestros resultados también mostraron una menor expresión de receptores presentes en progenitores hematopoyéticos como son; MPL, receptor para la TPO (esta hormona es el regulador principal de la megacariopoyesis y la trombopoyesis); glicoforina A o GPA, y KIT. Curiosamente, el receptor de TPO en plaquetas, actúa “secuestrando” a la TPO libre en plasma, para así regular la producción plaquetaria de manera retroactiva: si la masa de plaquetas es elevada, habrá menos concentración de TPO libre, y la producción será sostenida. Si por el contrario la masa es reducida, la TPO libre en plasma aumenta, induciendo la producción de una nueva remesa plaquetaria. Nuestros resultados apoyan la noción de que los niveles de TPO libre en plasma de neonatos son más elevados, porque las plaquetas no la secuestran como ocurre en adultos, al tener un nivel más bajo de MPL en su superficie. Esto permite que aunque la producción de plaquetas por MK sea menor en neonatos, que haya mayor número de MKs, nivelando así la producción final. Además, las implicaciones de este resultado son también de relevancia en medicina transfusional: una transfusión de sangre adulta, cuyas plaquetas presentan una mayor expresión de receptores para la TPO, a un niño recién nacido, en el cual los niveles de TPO son más elevados, podría desencadenar una producción y diferenciación megacariocítica aberrante, por “secuestro” indebido de TPO libre en plasma.

El presente estudio es muy amplio, y en el periodo de realización del TFM no hemos podido incluir a todos los grupos etarios. Además, a lo largo del trabajo nos hemos encontrado ciertos obstáculos que hemos tenido que ir librando. Estos obstáculos se deben en primer lugar a la necesidad de adaptar los protocolos de análisis estándar de función plaquetaria para poder aprovechar muestras de sangre que se tomarían para realizar un hemograma, evitando la extracción de muestras *ex profeso* para el estudio. El poder analizar muestras de neonatos de esta manera, teniendo en cuenta premisas éticas, será un avance considerable en el campo, donde la mayoría de los estudios se han realizado y todavía se realizan en sangre de cordón umbilical. Eso ha requerido optimizar la adición de calcio a muestras de sangre anticoagulada con EDTA.

Por la misma razón, se incluyen en el estudio niños a los cuales se les va a realizar una intervención, sin presentar comorbilidades de ningún tipo, aprovechando canalización y pensando si sería posible incluso tomar la muestra bajo el efecto de la anestesia (por

causar menor impacto/estrés en el niño). Sin embargo, el método de extracción es crucial si se quiere tener una muestra con plaquetas sin alteración, y la anestesia también tiene efectos en la función plaquetaria (**Figura 17**). En neonatos la extracción es por goteo, y es “óptima” para no alterar a las plaquetas. Pero sí que hemos observado algún efecto derivado de la anestesia durante el parto en la función plaquetaria del neonato, y este estudio permitirá también profundizar en este aspecto.

## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN



*Figura 17: Métodos de extracción de sangre venosa. El mejor método de extracción para nuestro estudio es la extracción con vacío y palomilla ya que supone la menor activación plaquetaria. En el caso de los neonatos la extracción por goteo también es óptima. Tanto la extracción con jeringuilla o con catéter venoso periférico es inadecuada debido a la activación plaquetaria y al riesgo de hemólisis. Imagen creada en Biorender.com.*

En resumen, el periodo de laboratorio durante mi TFM, ha servido para sentar las bases sobre las que continuará el estudio, además de haberse obtenido unos resultados preliminares muy prometedores. Los siguientes pasos por seguir incluirían, reevaluar los resultados obtenidos añadiendo la concentración de calcio óptima según el volumen de muestra, evaluar las agregaciones en plaquetas reconstituidas en plasma de un donante sano, de esta forma y aunque se aleje más del contexto fisiológico podremos asegurarnos de que ningún otro componente sanguíneo afecta a los resultados y estudiar la megacariopoyesis gracias a técnicas de cultivo celular (para lo cual se han ido congelado muestras de los voluntarios mayores de 18 años). Con todo esto tendríamos una visión global de la producción y función plaquetaria a lo largo del desarrollo permitiéndonos aportar este conocimiento a la clínica mejorando así los tratamientos de los pacientes relativos al manejo de la hemostasia, o en el campo de la medicina transfusional, especialmente en aquellos de menor edad.

## **7 CONCLUSIONES**

- 1- Las plaquetas de neonatos presentan diferencias frente a las adultas en cuanto a la expresión de receptores de superficie como son CD49B, GPVI, GPA y MPL y tasas de agregación cuando son estimuladas con colágeno.
- 2- Tanto la anestesia como el método de extracción afectan a la función plaquetaria.
- 3- Se puede estudiar la agregación plaquetaria en sangre total extraída en tubos de EDTA (lo que permite aprovechar muestras tomadas en clínica) una vez optimizada la concentración de calcio a añadir.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bluteau, D., Lordier, L., Di Stefano, A., Chang, Y., Raslova, H., Debili, N., & Vainchenker, W. (2009). Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03398.x>
- Bozdogan, N., Madenoglu, H., Dogru, K., Yildiz, K., Kotanoglu, M. S., Cetin, M., & Boyaci, A. (2005). Effects of isoflurane, sevoflurane, and desflurane on platelet function: A prospective, randomized, single-blind, in vivo study. *Current Therapeutic Research*, 66(4), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2005.08.010>
- Davenport, P., & Sola-Visner, M. (2022). Platelets in the neonate: Not just a small adult. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 6(3), 375–384. <https://doi.org/10.1002/rth2.12719>
- de Graaf, C. A., & Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*, 10(10), 1582–1589. <https://doi.org/10.4161/cc.10.10.15619>
- Del Vecchio, A., Motta, M., & Romagnoli, C. (2015). Neonatal Platelet Function. *Clinics in Perinatology*, 42(3), 625–638. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.04.015>
- Esiaba, I., Mousselli, I., M. Faison, G., M. Angeles, D., & S. Boskovic, D. (2019). Platelets in the Newborn. *Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86715>
- Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J. F., & Mautner, K. (2020). Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7794. <https://doi.org/10.3390/ijms21207794>
- Fox, S. C., May, J. A., Dovlatova, N., Glenn, J. R., Johnson, A., White, A. E., Radhakrishnan, A., & Heptinstall, S. (2019). How does measurement of platelet P-selectin compare with other methods of measuring platelet function as a means of determining the effectiveness of antiplatelet therapy? *Platelets*, 30(3), 290–295. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1434311>
- Gelman, B., Setty, B. N. Y., Chen, D., Amin-Hanjani, S., & Stuart, M. J. (1996). Impaired

- Mobilization of Intracellular Calcium in Neonatal Platelets. *Pediatric Research*, 39(4), 692–696. <https://doi.org/10.1203/00006450-199604000-00022>
- González Villalva, A., Bizarro-Nevarés, P., Rojas-Lemus, M., López-Valdés, N., Ustarroz-Cano, M., Barbosa-Barrón, F., García-Gil, B., Albarrán-Alonso, J. C., & Fortoul van der Goes, T. I. (2019). The megakaryocyte: a very original cell. *Revista de La Facultad de Medicina*, 62(1), 6–18. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.1.02>
- Haley, K. M., Recht, M., & McCarty, O. J. (2014). Neonatal platelets: mediators of primary hemostasis in the developing hemostatic system. *Pediatric Research*, 76(3), 230–237. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.87>
- Herken, K., Glauner, M., Robert, S. C., Maas, M., Zippel, S., Nowak-Göttl, U., Zieger, B., Lahav, J., Fender, A. C., Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2021). Age-Dependent Control of Collagen-Dependent Platelet Responses by Thrombospondin-1—Comparative Analysis of Platelets from Neonates, Children, Adolescents, and Adults. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4883. <https://doi.org/10.3390/ijms22094883>
- Israels S. J., Rand M. L., M. A. . (2003). Neonatal Platelet Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 29(4), 363–372. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42587>
- Israels, S. J., Cheang, T., Roberston, C., McMillan-Ward, E. M., & McNicol, A. (1999). Impaired Signal Transduction in Neonatal Platelets. *Pediatric Research*, 45, 687–691. <https://doi.org/10.1203/00006450-199905010-00014>
- Koupenova, M., Clancy, L., Corkrey, H. A., & Freedman, J. E. (2018). Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circulation Research*, 122(2), 337–351. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795>
- Lorenz V., Ferrer-Marin F., Israels S.J., S.-V. M. (2019). *Platelets*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03693-8>
- Machlus, K. R., & Italiano, J. E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*, 201(6), 785–796. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304054>
- Margraf, A., Nussbaum, C., & Sperandio, M. (2019). Ontogeny of platelet function.

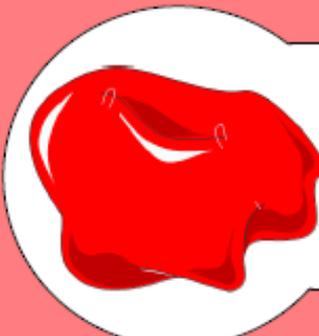
- Blood Advances*, 3(4), 692–703.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024372>
- Morita, Y., Iseki, A., Okamura, S., Suzuki, S., Nakauchi, H., & Ema, H. (2011). Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Experimental Hematology*, 39(3), 351–359.e3. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.12.008>
- Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M., & Modjeski, K. L. (2014). *Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells*. <https://doi.org/10.1182/blood>
- Rubenstein, D. A., & Yin, W. (2018). Platelet-activation mechanisms and vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1117–1156.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c170049>
- Schulze, H., & Shivdasani, R. A. (2005). Mechanisms of thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1717–1724. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01426.x>
- Sitaru, A. G., Holzhauser, S., Speer, C. P., Singer, D., Obergfell, A., Walter, U., & Grossmann, R. (2005). Neonatal platelets from cord blood and peripheral blood. *Platelets*, 16(3–4), 203–210. <https://doi.org/10.1080/09537100400016862>
- Sola-Visner, M. (2012). Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2012(1), 506–511.  
<https://doi.org/10.1182/asheducation.v2012.1.506.3798532>
- Sola-Visner, M., & Bercovitz, R. S. (2016). Neonatal Platelet Transfusions and Future Areas of Research. *Transfusion Medicine Reviews*, 30(4), 183–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.tmr.v.2016.05.009>
- Sola-Visner, M. C. (2019). Platelet Transfusions in Neonates — Less Is More. *New England Journal of Medicine*, 380(3), 287–288.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMe1813419>
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., Hale, E. C., Newman, N. S., Schibler, K., Carlo, W. A., Kennedy, K. A., Poindexter, B. B., Finer, N. N., Ehrenkranz, R. A., Duara, S., Sánchez, P. J., O’Shea, T. M.,

- Goldberg, R. N., Van Meurs, K. P., ... Higgins, R. D. (2010). Neonatal Outcomes of Extremely Preterm Infants From the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, *126*(3), 443–456. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2959>
- Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2012). *Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure* (pp. 3–22). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1)
- van der Meijden, P. E. J., & Heemskerk, J. W. M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(3), 166–179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Wei, A. H., Schoenwaelder, S. M., Andrews, R. K., & Jackson, S. P. (2009). New insights into the haemostatic function of platelets. *British Journal of Haematology*, *147*(4), 415–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07819.x>
- Yu, M., & Cantor, A. B. (2012). Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: An update on cytokines and lineage surface markers. *Methods in Molecular Biology*, *788*, 291–303. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-307-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-307-3_20)

## ANEXO I

Infografía con información sobre el proyecto PEDIATHROMB para mayores de 12 años

# PEDIATHROMB



Las **plaquetas**, también conocidas como trombocitos, son células de la sangre. Las plaquetas juegan un papel importante en la coagulación sanguínea. Normalmente, si uno de tus vasos sanguíneos se rompe, comienza a sangrar. Las plaquetas entonces se agruparán (coagularán) para tapar la lesión en el vaso sanguíneo y detener el sangrado.

### ¿Cómo se forman las plaquetas?



Célula madre mieloide → Megacarioblasto → Megacariocito → Plaquetas

### ¿Qué supone tu participación?



Se te va a extraer una muestra de sangre de entre 10 y 20 mL.

La extracción, a veces, te puede ocasionar un pequeño **hematoma** o una leve inflamación que suele remitir en pocos días.



### Objetivo del estudio

El objetivo del proyecto **PEDIATHROMB** consiste en estudiar la función y producción plaquetaria durante el desarrollo, para poder entender mejor posibles patologías de las plaquetas según la edad del paciente y así poder proporcionar tratamientos personalizados y eficaces.

### Aclaraciones

Podremos acceder a tu historia clínica para obtener datos necesarios para el estudio, como el sexo o fecha de nacimiento.

Este estudio ha sido valorado y aprobado por un **Comité de Ética** acreditado. Así garantizamos que todo se realice conforme a unas exigencias éticas y se garantice tu anonimato en el estudio, del que en cualquier momento puedes retirarte sin consecuencias.

En el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser relevantes para tu salud o la de tu familia, puedes solicitar que se te comuniquen.

El material biológico obtenido tras procesado de la muestra de sangre formará parte de una colección del **Grupo de Investigación en Plaquetas** del ISPA destinada a la investigación biomédica.

## ANEXO II

Curvas de agregación con los distintos agonistas en los grupos etarios estudiados.

