Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de los mecanismos patogénicos relacionados con la trombopoyesis en la trombocitopenia autoinmune

Grodzielski, Matías

2017-03-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Grodzielski, Matías. (2017-03-23). Estudio de los mecanismos patogénicos relacionados con la trombopoyesis en la trombocitopenia autoinmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Grodzielski, Matías. "Estudio de los mecanismos patogénicos relacionados con la trombopoyesis en la trombocitopenia autoinmune". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-23.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de los mecanismos patogénicos relacionados con la trombopoyesis en la trombocitopenia autoinmune

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Matías Grodzielski

Director de tesis: Dra. Rosana F. Marta

Consejero de Estudios: Dra. Cecilia L. Varone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hematología Investigación, Unidad Ejecutora IDIM-CONICET, Instituto de Investigaciones Médicas “Alfredo Lanari”, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2017

Resumen

Estudio de los mecanismos patogénicos relacionados con la trombopoyesis en la trombocitopenia autoinmune

La presente Tesis de Doctorado propuso investigar la existencia de alteraciones en el proceso de trombopoyesis en la trombocitopenia inmune (PTI). Para ello se utilizó un modelo *in vitro* de diferenciación de megacariocitos a partir de progenitores hematopoyéticos CD34+ normales. Al día 13 de cultivo, los megacariocitos maduros se incubaron con muestras de plasma de pacientes con PTI evaluando su efecto sobre la formación de proplaquetas, la capacidad de adhesión y *spreading*, la apoptosis celular y la activación de señales intracelulares al contacto con proteínas de matriz de médula ósea.

Los plasmas de PTI produjeron una inhibición dosis-dependiente de la trombpoyesis, lo que se acompañó de alteraciones morfológicas en las proplaquetas. Además, estos plasmas no afectaron la madurez ni la sobrevida de los megacariocitos, lo que sugiere que las alteraciones en la producción plaquetaria son ocasionadas por un efecto directo sobre el proceso de trombopoyesis. La fracción de inmunoglobulinas G purificadas de los pacientes reprodujo la inhibición, mientras que la eliminación de los autoanticuerpos del plasma la revirtió, demostrando que son los autoanticuerpos los responsables, al menos en parte, de estas alteraciones. Además de la trombopoyesis, los plasmas con autoanticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas IIb-IIIa y Ia-IIa afectaron la capacidad de adhesión y *spreading* de los megacariocitos a los ligandos medulares de estos receptores, fibrinógeno y colágeno I, respectivamente. En particular, la presencia de anticuerpos anti-GPIa-IIa de PTI provocó una pérdida de la capacidad fisiológica del colágeno I de inhibir la trombopoyesis, lo que sugiere que podría ocurrir liberación de plaquetas en forma prematura en el contexto del nicho osteoblástico medular. La existencia de alteraciones trombopoyéticas en presencia de plasmas de PTI sin autoanticuerpos detectados sugiere la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra blancos alternativos.

La presente Tesis de Doctorado expone resultados novedosos que demuestran que los autoanticuerpos de PTI tienen un efecto nocivo sobre la trombopoyesis y sobre otras funciones megacariocíticas, revelando nuevos mecanismos que contribuyen a la disminución del recuento de plaquetas en esta entidad.

Palabras clave: Trombocitopenia Inmune, trombopoyesis, megacariocitos, proplaquetas, autoanticuerpos.

Abstract

Pathogenic mechanisms related to thrombopoiesis in autoimmune thrombocytopenia

This PhD thesis was aimed at investigate possible alterations in the thrombopoietic process in immune thrombocytopenia (ITP). To this end, an *in vitro* model of megakaryocyte differentiation from normal CD34+ hematopoietic progenitors was used. At day 13 of culture, mature megakaryocytes were incubated with plasma samples from patients with ITP and the effect on proplatelet formation was evaluated. Besides, we studied the ability of megakaryocytes to adhere and spread on different matrices, cellular apoptosis and the activation of intracellular signalling after contact with bone marrow matrix proteins.

ITP plasmas induced a dose-dependent inhibition on thrombopoiesis, that was accompanied by morphological alterations in proplatelet architecture. In addition, these samples did not affect either maturity or survival of megakaryocytes, suggesting that alterations in platelet production are due to a direct effect on the thrombopoietic process. The purified fraction of immunoglobulins G from ITP patients reproduced the inhibition, while elimination of autoantibodies from plasma reverted it, demonstrating that autoantibodies are responsible, at least in part, for these alterations. In addition to thrombopoiesis, plasmas containing autoantibodies directed against glycoproteins IIb-IIIa and Ia-IIa affected megakaryocyte adhesion and spreading to the corresponding ligands, fibrinogen and collagen I, in bone marrow. In particular, the presence of anti-GPIa-IIa autoantibodies caused a loss of the physiological ability of collagen I to inhibit thrombopoiesis, suggesting that premature platelet release could occur in the context of the bone marrow osteoblastic niche. The finding of abnormalities on thrombopoiesis in the presence of ITP plasmas with no detectable autoantibodies suggests the presence of alternative targets of autoimmunity in these samples.

This PhD thesis presents new results demonstrating that ITP autoantibodies have a deleterious effect on thrombopoiesis and other megakaryocytic functions, revealing new mechanisms that contribute to the decrease of the platelet count in this entity.

Keywords: Immune thrombocytopenia, thrombopoiesis, megakaryocytes, proplatelets, autoantibodies.

Agradecimientos

Por un lado, quisiera agradecer a la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme formado como Licenciado en Ciencias Biológicas de forma gratuita y en un marco de excelencia académica. Al Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari" por la provisión de los espacios y laboratorios donde este trabajo fue llevado a cabo. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas, brindándome la ayuda financiera que me permitió desarrollar mi doctorado.

Quisiera agradecer al Laboratorio de Hematología Investigación por abrirme sus puertas y permitirme desarrollar mi Doctorado y así iniciar el camino de mi carrera científica.

Por otro lado, quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron, ayudaron, guiaron y formaron parte, directa o indirectamente, de esta etapa.

En primer lugar, quisiera agradecerle enormemente a Rosana por su dirección a lo largo de este proyecto en el que, además de ser una gran investigadora, me mostró que es una maravillosa persona. No sólo por guiarme, apoyarme, enseñarme y estar hombro a hombro conmigo cuando la necesité, sino por hacer todo eso con una sonrisa y con la mejor predisposición.

A todas las chicas del laboratorio de Hematología Investigación por enseñarme, tenerme paciencia, darme siempre una mano y ponerle la mejor onda al día a día. A Felisa, Paula, Nora, Ani, Pao, Yesi y Ceci.

Finalmente, a toda mi familia y a todos mis amigos que siempre han estado a mi lado, especialmente durante este largo y exigente proceso, apoyándome y compartiendo conmigo los buenos y no tan buenos momentos.

Gracias.

Índice

Índice

Resumen 2

Abstract 4

Agradecimientos 6

Abreviaturas 13

1. Introducción 16

1.1. Plaquetas y megacariocitos 17

1.1.1. La médula ósea 17

1.1.2. Los nichos medulares 18

1.1.3. El desarrollo de los megacariocitos 20

1.1.4. Formación de plaquetas 23

1.1.5. Glicoproteínas del linaje megacariocítico como moduladores de la trombopoyesis 30

1.2. Trombocitopenia autoinmune o trombocitopenia inmune 32

1.2.1. Incidencia de PTI 32

1.2.2. Diagnóstico y clínica de PTI 33

1.2.3. Tratamiento de PTI 34

1.2.4. Fisiopatología y mecanismos subyacentes de PTI 36

2. Hipótesis y Objetivos 42

2.1. Hipótesis 43

2.2. Objetivos 44

3. Materiales y Metodologías 46

3.1. Materiales 47

3.1.1. Reactivos utilizados para la preparación de anticoagulantes y soluciones 47

3.1.2. Anticoagulantes 47

3.1.3. Soluciones generales 48

3.1.4. Soluciones para la purificación de las inmunoglobulinas G 49
3.2. Metodologías 49
3.2.1. Muestras biológicas..... 49
3.2.1.1. Consideraciones éticas 49
3.2.1.2. Obtención de progenitores hematopoyéticos CD34+..... 50
3.2.1.3. Obtención de células mononucleares y células CD3+ 51
3.2.1.4. Obtención de plasmas 51
3.2.2. Congelamiento y descongelamiento de células..... 52
3.2.3. Cultivos celulares 53
3.2.4. Análisis de pureza y madurez de los MKs por citometría de flujo 53
3.2.5. Identificación de la especificidad de los autoanticuerpos antiplaquetarios presentes en el plasma de los pacientes con PTI 54
3.2.6. Purificación de las inmunoglobulinas G plasmáticas 54
3.2.7. Inmunodepleción de los autoanticuerpos plasmáticos..... 55
3.2.8. Recuento de proplaquetas (PPs) en suspensión..... 55
3.2.9. Inhibición de la formación de PPs sobre colágeno de tipo I..... 56
3.2.10. Análisis de las características apoptóticas y morfológicas de MKs y PPs. 56
3.2.11. Estudios funcionales de las GPs 58
3.2.11.1. Unión de PAC-1 58
3.2.11.2. Adhesión y spreading de los MKs 58
3.2.11.3. Activación de las vías de señalización de las GPs 59
3.2.12. Estudios de interacción con células CD3+ y mononucleares de sangre periférica..... 60
3.2.13. Detección de marcadores apoptóticos por citometría de flujo..... 61
3.2.13 .1. Detección de fosfatidilserina..... 61
3.2.13.2. Detección de caspasas 3 y 7 activadas..... 61
3.2.14. Análisis estadístico..... 62
4. Resultados 63

4.1. Plasmas recalcificados de pacientes con PTI 64
4.2. Efecto del plasma recalcificado de pacientes con PTI sobre la trombopoyesis 65
4.2.1. Los plasmas de PTI inducen inhibición de la formación de PPs 65
4.2.2. El nivel de inhibición de la trombopoyesis depende de la dosis de plasma de PTI agregado 67
4.2.3. Los plasmas de PTI no afectan la maduración de MKs normales en la etapa final de su desarrollo 68
4.2.4. Relación entre la inhibición de la formación de PPs y las características bioquímicas y clínicas de los pacientes con PTI 68
4.2.4.1. Recuento de plaquetas y datos poblacionales 68
4.2.4.2. Manifestaciones hemorrágicas 69
4.2.4.3. Tratamiento 69
4.2.5. Anticuerpos anti-plaquetarios 71
4.2.6. Los plasmas de PTI reducen la complejidad de las PPs 72
4.3. Efecto de las inmunoglobulinas G de PTI sobre la trombopoyesis 76
4.4. Alteración de la funcionalidad de los receptores megacariocíticos blanco de los autoanticuerpos 77
4.4.1. Formación de PPs sobre fibrinógeno y colágeno de tipo I 78
4.4.2. Unión del PAC-1 al sitio activo de la glicoproteína IIb-IIIa de MKs normales en presencia de autoanticuerpos anti-GPIIb-IIIa de PTI 80
4.4.3. Adhesión y spreading de MKs sobre ligandos de los receptores blanco de los autoanticuerpos 81
4.4.4. Señalización río abajo de las GPs 85
4.5. Efecto del plasma de pacientes con PTI sobre la muerte de los MKs 88
4.5.1. Efecto directo de los plasmas de PTI en la sobrevida de MKs 88
4.5.2. Efecto del plasma de PTI como mediador de citotoxicidad sobre MKs 90
5. Discusión 92
5.1. Los plasmas de PTI inhiben la formación de proplaquetas 93

5.2. La inhibición en el número de MKs formando PPs estuvo asociada a la reducción de la complejidad de los procesos proplaquetarios 94
5.3. Los anticuerpos antiplaquetarios serían responsables de estas alteraciones ... 95
5.4. La interacción de los MKs con su entorno se vería afectada por los autoanticuerpos de PTI 97
5.5. Alteraciones producidas por los plasmas carentes de autoanticuerpos 99
5.6. Sobrevida de los MKs en PTI 100
5.7. Relación entre la inhibición de la trombopoyesis y las características clínicas de los pacientes con PTI 102
6. Conclusiones 103
7. Bibliografía 106

Abreviaturas

Abreviaturas

ANOVA – Análisis de la varianza.

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

ATP – Adenosina trifosfato.

BAC – Buffer anticoagulante.

BSA - Albúmina sérica bovina.

c-MPL – Receptor de trombopoyetina.

CD – Cluster de diferenciación.

CMHs – Células madre hematopoyéticas.

DE – Desvío estándar.

EDTA – Sal potásica del Ácido Etilen-Diamino-Tetracético.

ELISA - Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

Fc – Región constante de anticuerpo.

FITC – Fluoresceína-5-isotiocianato.

FLICA – Fluorocromo inhibidor de caspasas.

FvW – Factor von Willebrand.

GP – Glicoproteína.

GPIIb-IIIa – Glicoproteína IIb-IIIa, también conocida como integrina αIIbβ3.

GPIb-IX-V – Glicoproteína Ib-IX-V.

GPIa-IIa – Glicoproteína Ia-IIa, también conocida como integrina αIβ1.

HEPES – Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico.

IFI – Inmunofluorescencia indirecta.

Ig EV – Inmunoglobulina endovenosa.

IgA – Inmunoglobulina A.

IgM – Inmunoglobulina M.

IgG – Inmunoglobulina G.

MK – Megracariocito.

PAC-1 – Anticuerpo que reconoce el sitio active de la GPIIb-IIIa.

PBS – Buffer fosfato salino.

PE – Ficoeritrina.

PFA – Paraformaldehido.

PGE_1 – Prostaglandina E1.

PLQs – Plaquetas.

PMSF – Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPs – Proplaquetas.

SIM – Sistema de invaginación de membrana.

PTI – Trombocitopenia inmune.

Rpm – Revoluciones por minuto.

SFB – Suero fetal bovino.

Introducción

1. Introducción

1.1. Plaquetas y megacariocitos

Las plaquetas son pequeñas células anucleadas que desempeñan indispensables roles en la hemostasia y la trombosis (Linden y Jackson, 2010), en la curación de heridas (Menter y col., 2014), en el mantenimiento de la integridad vascular (HoTin-noé y col., 2011) y en la angiogénesis. Al mismo tiempo poseen importantes funciones durante el desarrollo de la inflamación, en la biología del cáncer (Gay y Felding-Habermann, 2011) y en la activación de la inmunidad innata (Smyth y col., 2009; Semple y col., 2011; Craig y col., 2014). Las plaquetas se forman a partir del citoplasma de los megacariocitos (MKs), sus células precursoras, que residen en la médula ósea (Pease, 1956). Durante su desarrollo, los MKs se vuelven poliploides y comienzan una rápida fase de expansión citoplásmica caracterizada por la formación de un elaborado sistema de reserva de membrana plasmática y por la acumulación de proteínas citoplasmáticas y gránulos esenciales para la función plaquetaria. Hacia las etapas finales de su maduración, los MKs experimentan una reorganización masiva de su citoesqueleto que dirige la formación de extensiones citoplásmicas, llamadas proplaquetas, que se ramifican y extienden hacia la luz de los sinusoides medulares donde sufren fisiones para transformarse en plaquetas. Este proceso de formación de proplaquetas y liberación de plaquetas por el megacariocito maduro se denomina trombopoyesis. Además de producir y liberar millones de plaquetas a la circulación, estudios recientes han establecido nuevos roles para los MKs como reguladores de la homeostasis y fisiología de la médula ósea a través de interacciones con diferentes componentes de la misma, tanto física como molecularmente (Malara y col., 2015).

1.1.1. La médula ósea

La médula ósea es un tejido blando y complejo dedicado a la producción de glóbulos blancos, rojos y plaquetas (Fliedner y col., 1985). Empaquetada en la cavidad de los huesos largos, la médula ósea constituye una red tridimensional de sinusoides ramificados rodeada de islotes de células hematopoyéticas sumergidas en una malla de componentes de matriz extracelular y factores solubles (Nilsson y col., 1998; Li y col., 2009; Smaniotto y col., 2013; Malara y col., 2014). En coexistencia con estos islotes hematopoyéticos se encuentran las células madre mesenquimales, importantes

células clonogénicas auto-renovadoras que al diferenciarse dan origen a la mayoría de las células estromales de la médula incluyendo a los condorcitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y miocitos (Pittenger y col., 1999; Short y col., 2003; Taichman y col., 2005; Wang y col., 2005; Muguruma y col., 2006).

Aunque las células madre hematopoyéticas residen principalmente en la médula ósea durante la adultez (Golde, 1991; Ogawa, 1993), el pool original de estas células se forma durante la embriogénesis emergiendo primeramente en la región aorta-gónadas-mesonefros y migrando posteriormente al saco vitelino, el hígado, el bazo y la placenta (Dzierzak y Speck, 2008; Ivanovs y col., 2011; Medvinsky y col., 2011; Morita y col., 2011). Es durante el nacimiento que las células hematopoyéticas comienzan a colonizar la médula ósea de la pelvis, el fémur y el esternón, convirtiéndolos en los sitios definitivos para el desarrollo de la hematopoyesis.

Los mecanismos de diferenciación de las células madre y su tránsito hacia el torrente sanguíneo deben estar estrictamente regulados de manera de satisfacer los requerimientos fisiológicos de producción y liberación de células sanguíneas. En este aspecto, descubrimientos sobre la caracterización de la estructura y función de la médula ósea han permitido identificar microambientes especializados, o nichos, implicados en la quiescencia, la diferenciación y la movilización de las células madre hematopoyéticas (Arai y col., 2004; Lo Celso y col., 2009).

1.1.2. Los nichos medulares

El concepto de nicho medular fue propuesto por primera vez por Schofield en 1978 para describir el microambiente fisiológicamente limitado en el que residen las células madre (Schofield, 1978). Estructuralmente, el nicho está formado por una variedad de células de soporte (estromales) que proporcionan un ambiente propicio para el mantenimiento de las células madre al generar factores que controlan tanto su número como su capacidad de auto-renovación y diferenciación a células especializadas (Spradling y col., 2001; Li, 2002; Fuchs y col., 2004; Li y Xie, 2005).

Las células madre hematopoyéticas residen junto a la superficie del endostio, revestido principalmente por osteoblastos. Allí los progenitores hematopoyéticos se autorenuevan por un lado y producen progenitores con capacidad migratoria por el otro (Figura 1; Gong, 1978; Taichman y col., 1996; Nilsson y col., 2001; Heissig y col., 2002). El papel de los osteoblastos como soporte del crecimiento de las células madre hematopoyéticas ha sido demostrado a partir de experimentos de co-cultivo in vitro (Taichman y Emerson, 1994; Taichman y col., 2000), así como de varios estudios

utilizando modelos mutantes de ratón (Calvi y col., 2003; Zhang y col., 2003; Arai y col., 2004). Consistentemente se observó que la ablación condicional de los osteoblastos conduce al agotamiento de las células hematopoyéticas (Visnjic y col., 2004). En esta zona se pueden identificar, además de los osteoblastos, otras células de linaje óseo y pericitos NG2+ (CSPG4) (Calvi y col., 2003; Greenbaum y col., 2013; Kunisaki y col., 2013). A partir de sus características, y su composición celular, a este microambiente se lo conoce como nicho osteoblástico.

Los progenitores hematopoyéticos con capacidad migratoria se dirigen hacia los vasos sanguíneos del centro de la cavidad medular a medida que maduran y se diferencian. Esta zona, denominada nicho vascular, está compuesta principalmente por células endoteliales, células CXCL12+ y células mesenquimales estromales nestina+ (Kiel y col., 2005; Kopp y col., 2005; Mendez-Ferrer y col., 2010). En este ámbito, la interacción de las células hematopoyéticas con el endotelio sinusoidal tendría un rol indispensable en la producción de células sanguíneas (Cardier y Barbera-Guillem, 1997; Li y col., 2004). En este sentido, se ha descripto que la ablación *in vivo* de células endoteliales utilizando anticuerpo anti-vascular endotelial cadherina (anti-VE-cadherina) conduce a la insuficiencia hematopoyética (Avecilla y col., 2004).

A pesar de las claras diferencias estructurales y funcionales entre el nicho osteoblástico y el nicho vascular, la definición anatómica de estos nichos como entidades separadas no resulta clara ya que la continuidad entre ambos es indispensable para coordinar la diferenciación eficiente de las células madre hematopoyéticas y la función general de la médula ósea. (Hanoun & Frenette, 2013).

En este contexto, los MKs migran, mientras se diferencian a partir de las células madre hematopoyéticas, desde el nicho osteoblástico al nicho vascular donde las plaquetas son liberadas al torrente sanguíneo (Figura 1; Hartwig e Italiano, 2003; Pallotta y col., 2009). Los MKs han sido históricamente asociados al nicho vascular ya que fueron detectados adyacentes a los sinusoides de la médula *ex vivo* así como *in vivo* por microscopía de fluorescencia intra-vital (Becker & De Bruyn, 1976; Junt y col., 2007; Kowata y col., 2014). Sin embargo, el análisis *ex vivo* de la localización de los MKs en la médula ósea de ratón demostró que estas células pueden estar localizadas en porciones anatómicas diferentes asociadas al endostio, a arteriolas y al nicho sinusoidal de la médula ósea (Heazlewood y col., 2013; Malara y col., 2014).

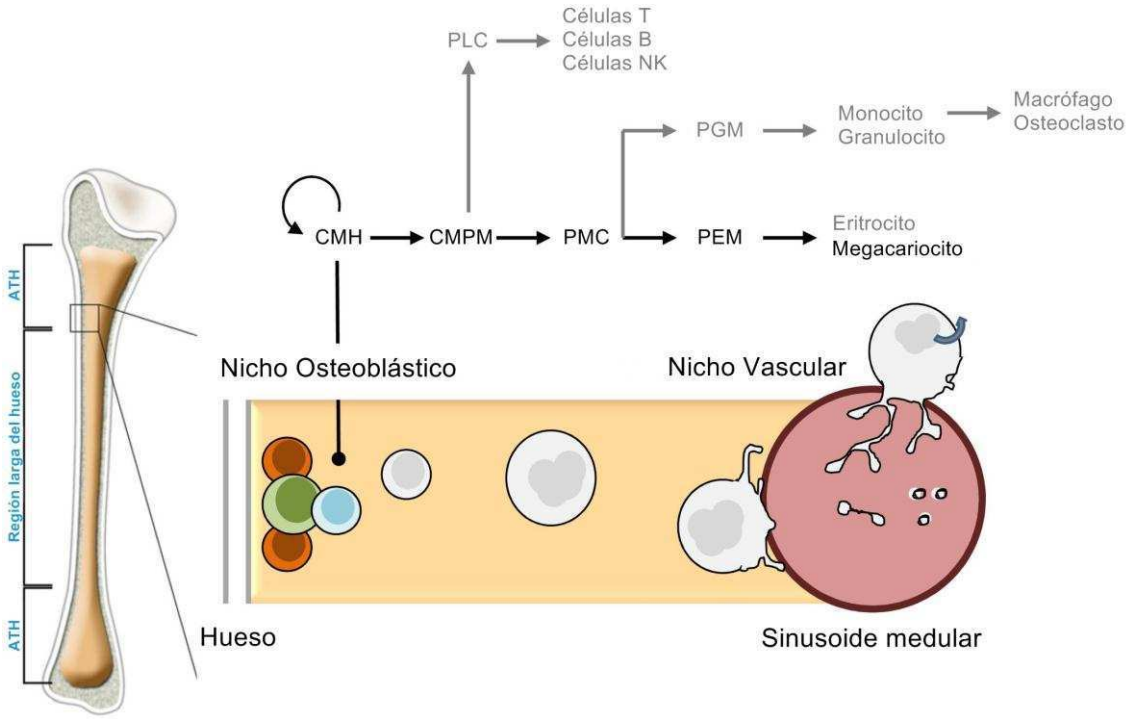


Figura 1. Resumen de la maduración de MKs y la producción de plaquetas. Las células madre hematopoyéticas (CMHs) que residen junto a la superficie del hueso endosteal producen progenitores que migran en dirección a los vasos sanguíneos en el centro de la cavidad de la médula ósea. En cada división, una sola célula hija prolifera y se diferencia en varios posibles linajes, entre los que se encuentra el megacariocítico. Un elaborado programa intracelular de amplificación nuclear y producción de proteínas en los MKs que maduran precede a la extensión mecánica de las proplaquetas hacia la luz de los vasos sanguíneos sinusoidales de la médula ósea. Las proplaquetas liberadas continúan madurando en la vasculatura y finalmente liberan plaquetas individuales de sus puntas. CMPM, células madre progenitoras multipotentes; PMC, progenitor mieloide común; PLC, progenitor linfoide común; PGM, progenitor granulocito/macrófágico; PEM, progenitor eritroide/megacariocítico; ATH, área trabecular del hueso. Adaptada de Thon e Italiano (2010).

1.1.3. El desarrollo de los MKs

Los MKs son las células más grandes y las más raras de la médula ósea, constituyendo alrededor del 0,01% del total de las células nucleadas medulares (Nakeff y Maat, 1974). Como todas las demás células de la sangre, se desarrollan a partir de células madre pluripotentes, que se auto-renuevan o se comprometen, perdiendo gradualmente su potencial de desarrollo, hacia un linaje celular específico que en última instancia da lugar a células sanguíneas maduras (Golde, 1991; Ogawa, 1993).

El modelo clásico de la hematopoyesis propone que el primer compromiso de las células madre hematopoyéticas ocurre durante la segregación de los linajes mieloides y linfoides, en base a la identificación de progenitores mieloides comunes (PMCs) (Akashi y col., 2000; Manz y col., 2002) y progenitores linfoides comunes (PLCs)

(Kondo y col., 1997). En la rama mieloide, los PMCs dan lugar a dos progenitores restringidos más, los progenitores granulocito-macrófágicos (PGMs) y los progenitores eritroide-megacariocítitos (PEMs) (Akashi y col., 2000). Éstos últimos, a su vez, dan lugar a precursores eritroides y megacariocíticos unipotentes (Nakorn y col., 2003; Pronk y col., 2007; Nishikii y col., 2015). Este modelo jerárquico ha sido muy útil para comprender la hematopoyesis, sin embargo, la identificación de nuevas poblaciones progenitoras permitió que surgiera un cuadro más complejo acerca del compromiso de las células madre hematopoyéticas hacia el linaje megacariocítico. En este escenario pueden surgir MKs directamente de las células madre hematopopéticas así como de progenitores multi, bi y unipotentes (Adolfsson y col., 2005; Forsberg y col., 2006; Yoshida y col., 2006; Luc y col., 2008).

Aunque difieren en algunos aspectos, los distintos modelos propuestos apoyan las fuertes evidencias que sugieren que los MKs se originan de un precursor bipotencial comprometido capaz de dar lugar a colonias biclonales compuestas de células megacariocíticas y eritroides (Sullivan y McDonald, 1993; Hunt, 1995; Debili y col., 1996). A partir de este progenitor, se generan precursores diploides que se comprometen con el linaje megacariocítico y que han sido tradicionalmente caracterizados en base a sus capacidades funcionales (Nakeff y col., 1976; Williams y col., 1982; Levin, 1983; Long y col., 1985).

Se han utilizado diversos esquemas de clasificación basados en las características morfológicas, la tinción histoquímica y los marcadores bioquímicos para categorizar las diferentes etapas del desarrollo de los MKs. En general, se pueden identificar tres tipos de morfologías en la médula ósea. El promegacarioblasto es el primer precursor megacariocítico reconocible (Figura 2). El megacarioblasto, o MK de estadio I, es una célula más madura (Long y col., 1982) con núcleo en forma de riñón y dos conjuntos de cromosomas (4N). Su diámetro es de 10 a 50 µm y es intensamente basófilo en preparaciones de médula teñidas con el colorante de Romanovsky, como resultado de la gran cantidad de ribosomas, aunque el citoplasma en esta etapa carece de gránulos. El megacarioblasto presenta protrusiones de la membrana plasmática, una alta relación nucleo-citoplasmática y es acetilcolinesterasa-positivo. El promegacariocito (proMK), o MK de estadio II, tiene un diámetro de 20 a 80 µm con un citoplasma policromático. El citoplasma del proMK es menos basófilo que del megacarioblasto y contiene gránulos en desarrollo.

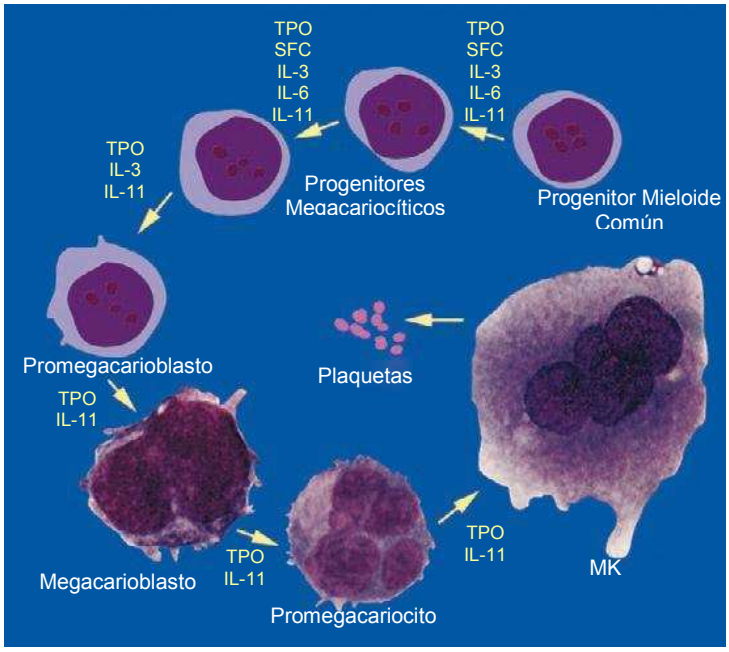


Figura 2. Desarrollo de MKs y plaquetas. De un progenitor mieloide común se originan los precursores que se comprometen con la diferenciación al linaje megacariocítico, los cuales expresan CD34, CD33 y CD41. Este último antígeno de superficie celular, CD41 (GPIIb), es un marcador de linaje de MKs. El promegacarioblasto es el primer precursor de MKs morfológicamente reconocible en la médula ósea. Los megacarioblastos tienen grandes núcleos ovalados con dos conjuntos de cromosomas y un citoplasma basófilo carente de gránulos. Los proMKs son más grandes y tienen citoplasma policromático. Los MKs son las células más grandes de la médula ósea, con diámetros de hasta 150 µm, y se caracterizan por tener un núcleo altamente multilobulado y citoplasma basófilo. La interleuquina (IL) -3, por sí sola, apoya las primeras etapas del desarrollo de los MKs hasta la fase de promegacarioblasto antes de la poliploidización. La trombopoyetina (TPO) es el principal regulador de la trombopoyesis y afecta a todas las etapas del desarrollo de los MKs. IL-6, IL-11, y el factor de células madre (SCF; kit ligand) también estimulan etapas específicas del desarrollo de los MKs, pero funcionan sólo en presencia de TPO o IL-3. Adaptada de Michelson (2013).

Al final de la fase de proliferación, los progenitores megacariocíticos salen del estado diploide para diferenciarse y sufrir endomitosis, resultando en células que poseen múltiplos de un contenido normal diploide de cromosomas (es decir, 4 N, 16N, 32N, 64N, 128N) (Odell y col., 1970). Aunque inicialmente se postuló que la poliploidización, esencial para la producción eficiente de plaquetas, podría ser el resultado de la ausencia de mitosis después de cada ronda de replicación del ADN, estudios posteriores de MKs primarios en cultivo demostraron que la endomitosis no es la consecuencia de una ausencia completa de mitosis, sino de su terminación prematura (Nagata y col., 1997; Vitrat y col., 1998; Raslova y col., 2003). De esta manera, los MKs se vuelven poliploides a través de ciclos repetidos de replicación del ADN sin división celular (Ebbe y Stohlman, 1965; Odell y col., 1968; Ebbe, 1976; Therman y col., 1983). Mientras que el número de ciclos puede oscilar entre dos y seis, la mayoría de los MKs experimentan tres ciclos endomitóticos para alcanzar un contenido de ADN de 16N. Esta poliploidización resulta en una amplificación funcional de genes, cuyo propósito es un aumento en la síntesis proteica en paralelo con el agrandamiento de la célula (Raslova y col., 2003).

Uno de los propósitos de la endomitosis es generar la síntesis de grandes cantidades de proteínas que, junto con los lípidos necesarios, contribuyen a crear el sistema de invaginación de membrana (SIM), anteriormente conocido como el sistema de demarcación de membrana. El SIM es un extenso complejo de cisternas y túbulos distribuidos a lo largo del citoplasma de los MKs que es continuo con la membrana plasmática y constituye un reservorio de la misma. Lo que aún se desconoce es si se origina a partir de invaginaciones de la membrana plasmática o si otros reservorios internos de membrana, como el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, contribuyen a su desarrollo.

Una vez completado el proceso de endomitosis, el MK comienza una etapa de maduración en la que el citoplasma se llena con proteínas plaquetarias y organelas y se termina de desarrollar el sistema tubular denso (Daimon y Gotoh, 1982). La maduración de los MKs se caracteriza, además, por la formación progresiva de una variedad de gránulos secretores. Los más abundantes son los gránulos α, que contienen proteínas esenciales para la adhesión plaquetaria durante la reparación vascular, tales como el factor plaquetario 4, la β-tromboglobulina, el factor de von Willebrand y el fibrinógeno. Estos gránulos, de 200-500 nm de diámetro y forma esférica con un núcleo central oscuro, adquieren su contenido molecular a través de la síntesis de proteínas endógenas así como por captación y empaquetado de proteínas plasmáticas por endocitosis mediada por receptores y por pinocitosis (Handagama y col., 1987). Varias proteínas de membrana críticas para la función plaquetaria también se envasan en los gránulos α, incluyendo la integrina αIIbβ3 (o GPIIb-IIIa), la P-selectina (CD62P) y el CD36. Por otra parte, los gránulos densos, de aproximadamente 250 nm de tamaño y caracterizados por poseer núcleos densos de electrones, contienen una variedad de sustancias hemostáticamente activas que se liberan tras la activación plaquetaria, incluyendo la serotonina, las catecolaminas, el ADP, el ATP y el calcio.

1.1.4. Formación de plaquetas

A lo largo de los años, se han propuesto varios modelos de producción de plaquetas (Figura 3). Estos incluyen (a) brote de las plaquetas, (b) fragmentación citoplásmica a través del sistema de invaginación de membrana, y (c) formación de proplaquetas. Estudios anteriores que intentaron discriminar entre estos mecanismos de biogénesis plaquetaria se han visto obstaculizados por la necesidad de extraer muestras de médula ósea para obtener MKs, la baja frecuencia de MKs en ella y la

falta de sistemas *in vitro* que reconstituyan fielmente la formación de plaquetas. Sin embargo, el descubrimiento de la trombopoyetina (TPO), la citoquina que se une al receptor específico de MKs, c-MPL, y promueve el crecimiento y desarrollo de sus precursores, ha permitido el desarrollo de sistemas de cultivo que recapitulan la biogénesis plaquetaria resultando en una nueva comprensión de la fase de diferenciación terminal de la trombopoyesis.

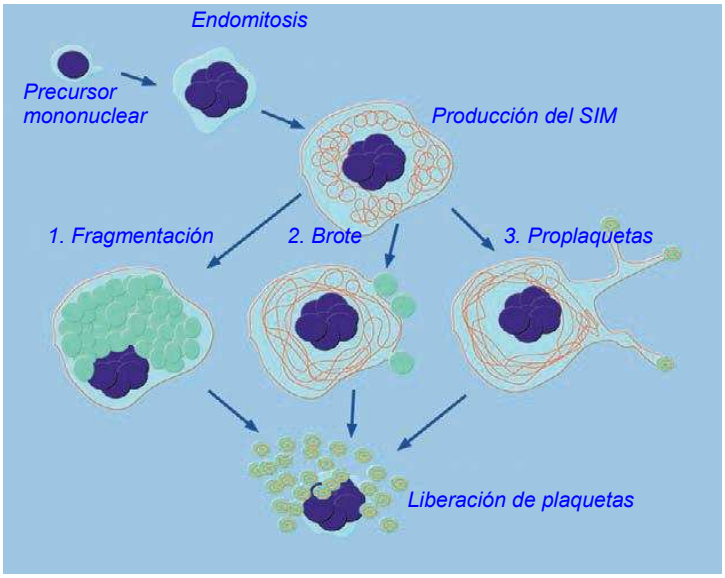


Figura 3. Mecanismos propuestos para la producción de plaquetas. Se han propuesto tres modelos para explicar la mecánica de la producción de plaquetas. El primero es la fragmentación citoplásmica a través del sistema de invaginación de membrana (SIM). En este modelo, el SIM define campos predeterminados de tamaño de plaquetas dentro del citoplasma de los MKs. Las plaquetas se forman cuando se liberan los fragmentos del citoplasma a lo largo de las líneas de fractura del SIM. La segunda es el brote de plaquetas. En este modelo, las plaquetas se desprenden de protusiones que sobresalen en la periferia de los MKs. El tercero es la formación de proplaquetas. El modelo de flujo de la formación de proplaquetas requiere que las plaquetas se formen a través de estas estructuras intermediarias que son prolongaciones citoplasmáticas largas que aparecen como cuentas de tamaño de plaquetas unidas entre sí por finas hebras citoplásmicas. En este modelo, el SIM funciona principalmente como un reservorio de membrana para la extensión de las proplaquetas (Schulze y col., 2006). Adaptada de Michelson (2013).

La mayor parte de la evidencia experimental apoya el modelo de formación de plaquetas a partir de PPs (Shivdasani y col., 1995, 1997; Lecine y col., 1998). Estas estructuras proplaquetarias se han observado tanto *in vivo* mediante la obtención de imágenes de proplaquetas extendiéndose hacia los vasos sanguíneos sinusoidales de la médula ósea (Behnke, 1969; Becker y De Bruyn, 1976; Schmitt y col., 2001; Junt y col., 2007; Zhang y col., 2012) como *in vitro* a partir de MKs derivados de células madre de hígado fetal murino (Italiano y col., 1999; Patel y col., 2005b; Thon y col., 2010, 2012) y de células humanas (Choi y col., 1995; Miyazaki y col., 2000; Chang y col., 2007; Dunois-Lardé y col., 2009). Además, la existencia de proplaquetas se ha constatado en una amplia gama de especies de mamíferos (Handagama y col., 1987; Leven, 1987; Tablin y col., 1990; Miyazaki y col., 1992; Choi, 1997).

El desarrollo de cultivos de MKs que reconstituyen fielmente la generación de plaquetas ha proporcionado sistemas para estudiar el mecanismo de formación de

proplaquetas *in vitro*. A través de video-microscopía se revela tanto el cambio temporal como espacial que conduce a la formación de proplaquetas (Figura 4; Italiano y col., 1999). La transformación del citoplasma del MK concentra virtualmente todo el contenido intracelular en las extensiones proplaquetarias y en sus engrosamientos de tamaño plaquetario (swelligns), los cuales, en las etapas finales, parecen cuentas dispuestas en tándem unidas por puentes citoplásmicos delgados. La transformación se desarrolla durante 4 a 10 horas y comienza con la erosión de un polo (Figura 4, asterisco a las 0 hs) del citoplasma de MKs. Inicialmente se forman pseudópodos gruesos que se elongan posteriormente en tubos finos de diámetro uniforme de 2 a 4 µm. Estos túbulos delgados, a su vez, experimentan un proceso dinámico de flexión y ramificación y desarrollan engrosamientos periódicos a lo largo de su longitud. Eventualmente, el MK se transforma en núcleos desnudos residuales rodeados por una red anastomosada de procesos proplaquetarios. Este proceso termina cuando una rápida retracción separa los fragmentos de las proplaquetas del cuerpo celular, liberándolos al cultivo (Figura 4, asterisco a la derecha inferior a las 10 hs).

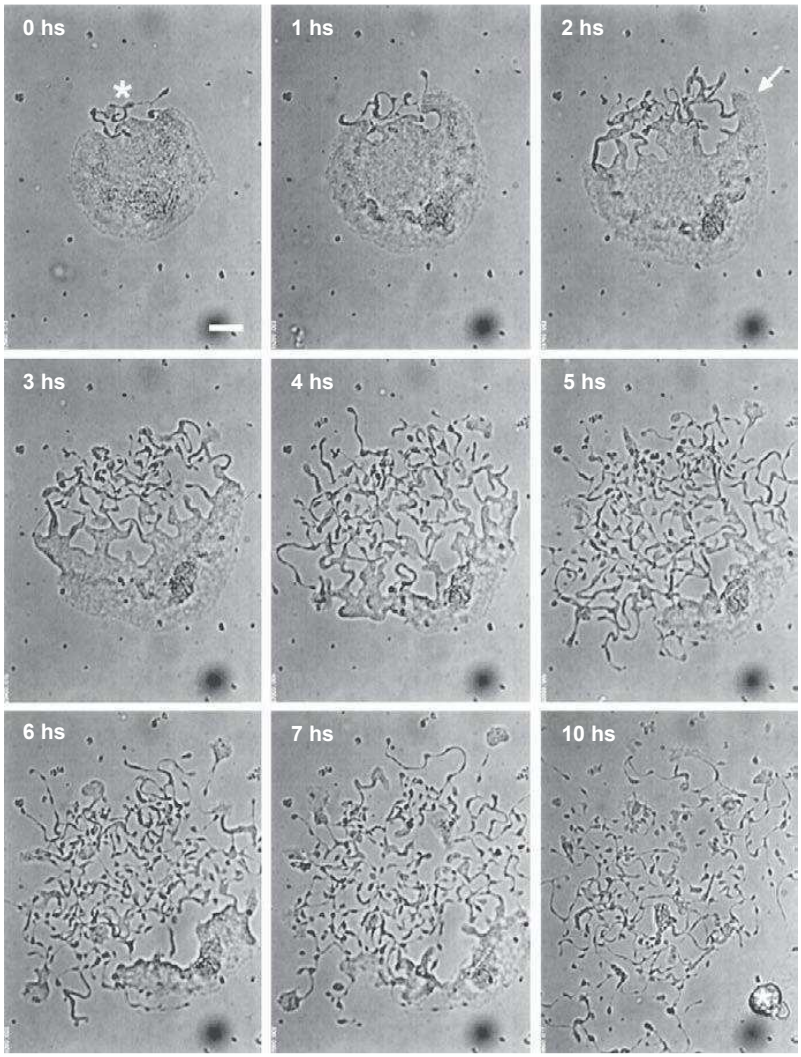
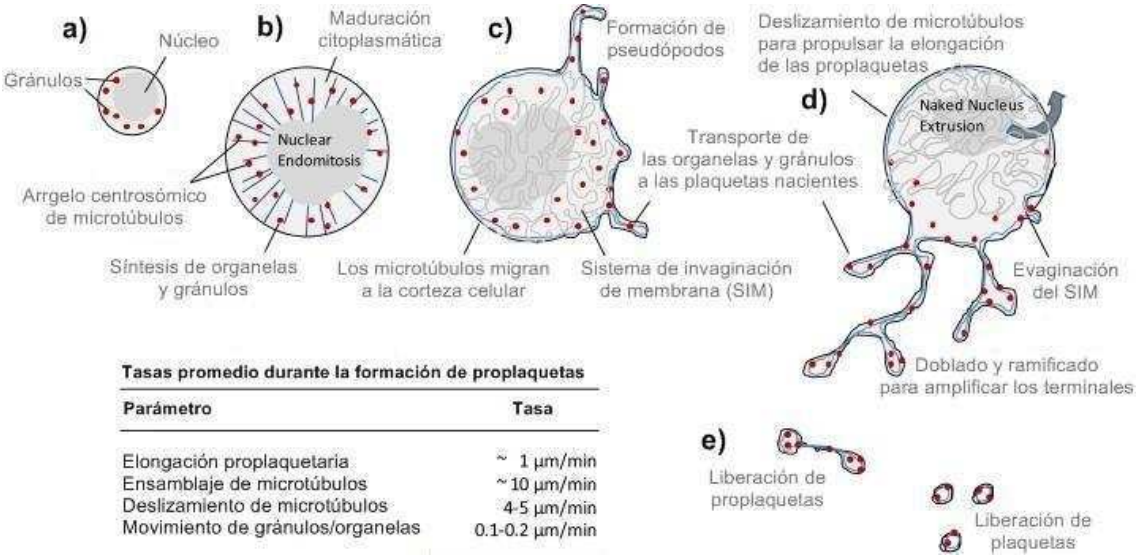


Figura 4. Video-microscopía óptica de un MK de ratón formando proplaquetas *in vitro*. Durante los estadios iniciales de la formación de proplaquetas, el MK se expande y su citoplasma cortical comienza a emitir prolongaciones en un polo. A medida que este proceso continua, el citoplasma en el sitio de erosión se remodela en pseudópodos grandes (flecha blanca a las 2 h) que se alargan y afinan con el tiempo, formando tubos estrechos de 2 a 4 µm de diámetro. Las extensiones proplaquetarias se curvan frecuentemente (flecha blanca a las 2 hs), y los sitios de flexión se bifurcan subsecuentemente para generar nuevos procesos proplaquetarios. De esta manera, todo el volumen citoplasmático del MK se convierte en extensiones ramificadas de proplaquetas cuyos extremos se incrementan

dramáticamente. Las proplaquetas también desarrollan constricciones segmentadas a lo largo de su longitud aparentando un collar de cuentas. El proceso de elaboración de proplaquetas termina en una rápida retracción que separa los filamentos proplaquetarios del núcleo desnudo residual (asterisco en derecha inferior a las 10 horas). La barra de escala es de 20 µm. Adaptada de Italiano y colaboradores (1999).

Estudios realizados por De Botton y colaboradores (2002) postularon que la serie de eventos que conducen a la formación de proplaquetas está dirigida, en parte, por la activación de mecanismos de apoptosis que ocurren en zonas restringidas del citoplasma del MK, dando como producto final un núcleo apoptótico remanente. Sin embargo, posteriormente se demostró que los MKs deben ser viables y no mostrar signos de muerte celular para el normal desarrollo de la trombopoyesis (Kile y col., 2009).

La acumulación de evidencias sugiere que el citoesqueleto es la principal maquinaria responsable de la producción de plaquetas (Figura 5; Hartwig e Italiano, 2006; Thon y col., 2010). El citoesqueleto sufre una masiva reorganización en la que los ejes de las proplaquetas se llenan de gruesos haces de microtúbulos (Figura 5b-c) que se someten a una fase de afinamiento y extensión y forman un bucle para volver a entrar al eje, generando así brotes en la punta de las proplaquetas (Tablin y col., 1990; Hartwig e Italiano, 2006). La elongación de las proplaquetas ocurre hacia afuera debido a la disposición bipolar de los haces de microtúbulos distribuidos a lo largo del eje de las proplaquetas que se alargan mediante la continua polimerización de la tubulina en sus extremos positivos libres y el deslizamiento de los microtúbulos superpuestos accionado por la proteína motora dineína (Lecine et al., 2000, Patel et al. 2005a, Hartwig e Italiano, 2006, Bender y col., 2015). La β1-tubulina es la principal isoforma de tubulina en los MKs. Los ratones que carecen de β1-tubulina producen un 60% menos de plaquetas y las plaquetas que se producen muestran defectos estructurales y funcionales, incluyendo un contenido reducido de microtúbulos y menos enrollamientos de éstos alrededor de la periferia de las plaquetas (Schwer y col., 2001). En seres humanos, las mutaciones en la β1-tubulina resultan en una macrotrombocitopenia autosómica dominante (Kunishima y col., 2009). Del mismo modo, la F-actina está presente a lo largo de las proplaquetas y forma los puntos de ensamblaje requeridos para que se doblen y bifurquen (Italiano y col., 1999; Patel y col., 2005a). La miosina II es también un importante componente en la formación de proplaquetas, como lo demuestran las anormalidades relacionadas a la mutación del gen MYH9 en la anomalía de May-Hegglin y en las macrotrombocitopenias relacionadas, donde la actividad de esta proteína está reducida (Kelley y col., 2000, Seri y col., 2000).



Tasas promedio durante la formación de proplaquetas

Parámetro	Tasa
Elongación proplaquetaria	~ 1 µm/min
Ensamblaje de microtúbulos	~10 µm/min
Deslizamiento de microtúbulos	4-5 µm/min
Movimiento de gránulos/organelas	0.1-0.2 µm/min

Figura 5. Mecanismos citoesqueléticos de la producción de proplaquetas y liberación de plaquetas. Una serie sistemática de eventos ocurre a medida que los MKs pasan de ser células inmaduras (a) a liberar plaquetas (e). (b) Los MKs inmaduros se someterán a ciclos repetidos de endomitosis nuclear con el fin de permitir la síntesis de organelas y la maduración y expansión citoplasmática. (c) Antes del inicio de la formación de proplaquetas, los centrosomas se desensamblan y los microtúbulos se trasladan a la corteza celular. Un sistema de invaginación de membrana, continuo con la membrana superficial de la célula, proporciona un reservorio de membrana para el crecimiento de los procesos proplaquetarios. Gruesos haces de microtúbulos llenan el eje y la corteza de los pseudópodos que posteriormente se extenderán. (d) El deslizamiento de los microtúbulos solapados impulsa la elongación de las proplaquetas a medida que las organelas son movilizadas a los extremos de las mismas. La formación de proplaquetas continúa expandiéndose a lo largo de la célula mientras que la flexión y ramificación amplifican los extremos existentes. (e) El citoplasma completo de los MKs se convierte en una masa de proplaquetas que se liberan de la célula. A medida que las proplaquetas se elongan, sus haces de microtúbulos se retuercen, poniendo en contacto los haces opuestos y permitiendo que se compriman juntos en el eje de las proplaquetas. Esto forma bucles en los extremos de las proplaquetas donde los gránulos y las organelas quedan atrapados. Los movimientos deslizantes de los microtúbulos en el eje estiran aún más las proplaquetas liberadas y separan los extremos del eje, mediando la liberación de las plaquetas. Adaptada de Thon e Italiano (2010).

Además de desempeñar un papel esencial en la extensión de las proplaquetas, los microtúbulos cumplen una segunda función: transportar las organelas y los gránulos a lo largo de las proplaquetas permitiendo su almacenaje en los extremos de las mismas (Figura 5c-d). En MKs, los gránulos derivan del brote de pequeñas vesículas de la red trans-Golgi que contienen la carga de los gránulos (Blair y Flaumenhaft, 2009). Estas vesículas son dirigidas a cuerpos multivesiculares, donde las proteínas se clasifican y finalmente se envasan en los gránulos (Youssefian y Cramer, 1997; Heijnen y col., 1998). Las organelas y los gránulos se envían individualmente desde el cuerpo celular del MK a las proplaquetas hasta que son capturados en las puntas de las mismas. Este proceso de transporte abarcaría dos aspectos diferentes. Por un lado, la asociación de kinesinas con los gránulos y las

organelas en las proplaquetas sugiere que esta familia de proteínas motoras proporciona la fuerza móvil que mueve la carga utilizando los haces de microtúbulos de estos procesos proplaquetarios como rutas (Italiano y col., 2007). Esto es posible dado que las kinesinas intervienen en el transporte anterógrado de vesículas, es decir que implica un movimiento hacia la parte más distal de la célula, hacia el extremo positivo de los microtúbulos, sobre los que se desplazan. Por otro lado, los microtúbulos se deslizan bidireccionalmente en relación con otros filamentos móviles, moviendo indirectamente a las organelas a lo largo de las proplaquetas (Richardson y col., 2005).

Además de funcionar como líneas de ensamblaje para la producción de plaquetas, la arquitectura y morfología de las proplaquetas proporcionan un mecanismo para suministrar plaquetas al torrente sanguíneo. Debido a su posición única en la interfase vascular, los MKs se encuentran eficazmente expuestos a un gradiente transendotelial de componentes sanguíneos. Zhang y colaboradores (2012) aprovecharon este fenómeno e identificaron la esfingosina-1-fosfato (S1P) y su receptor en los MKs, S1pr1, como importantes mediadores de la extensión y liberación de las proplaquetas. Una vez en la sangre, las proplaquetas se exponen a una alta concentración de S1P, lo que inicia el posterior desprendimiento de plaquetas a la circulación. Utilizando ratones knockout para S1pr1 y microscopía intravital multifotón, los autores mostraron que el gradiente de S1P guía a las extensiones proplaquetarias hacia el lumen de los sinusoides de la médula ósea y que los ratones que carecen de S1pr1 desarrollan una grave trombocitopenia causada por la formación de proplaquetas extravasculares y la defectuosa liberación de éstas dentro del espacio vascular. Además, demostraron que la activación de la señalización de Gi/Rac GTPasa, río debajo de S1pr1 estimula directamente la liberación de nuevas plaquetas.

Una vez que el lumen es "detectado" por el MK, los podosomas, estructuras cilíndricas ricas en actina que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática, degradan activamente proteínas de la matriz extracelular, como el fibrinógeno, favoreciendo la extensión de proplaquetas a través de la membrana basal (Schachtner y col., 2013). Por otro lado, la corriente de la sangre constituye una fuerza que ayuda a elongar y organizar las extensiones citoplasmáticas en la dirección del flujo sanguíneo y, a su vez, a separar los fragmentos de las proplaquetas del cuerpo celular del MK (Junt y col., 2007; Dunois-Lardé y col., 2009).

Los MKs liberan una mezcla heterogénea compuesta por estructuras de tipo proplaquetas y plaquetas en la sangre, indicando que la formación terminal de plaquetas podría continuar en el torrente sanguíneo. La presencia de estructuras de tipo proplaquetas en la sangre ha sido reconocida desde hace tiempo, por lo que es

probable que las proplaquetas se fragmenten del cuerpo del MK, penetren en la sangre y maduren a plaquetas mientras están en circulación. En el año 2010, Schwertz y colaboradores revelaron que las plaquetas son capaces de producir progenie; las plaquetas producen estructuras con forma de mancuerna con dos bulbos de tamaño plaquetario en cada extremo que contienen sus propias organelas y su sistema citoesquelético (Figura 5e). Este evento se produce *in vitro* durante unas pocas horas, depende de una red microtubular intacta y se asocia con una mayor síntesis de proteínas. Ese mismo año, se identificó una nueva etapa en la formación de plaquetas presente tanto en MKs en cultivo como en frotis de sangre periférica, las preplaquetas (Thon y col., 2010). Estas estructuras son partículas anucleadas discoidales, de 2-10 µm de diámetro, que pueden convertirse reversiblemente en proplaquetas con forma de mancuerna (Figura 6, etapa 5; Thon y col., 2012). Esta conversión está mediada por microtúbulos, cuya polimerización bidireccional en la proplaqueta con forma de mancuerna forma dos bobinas de tamaño plaquetario (2 µm de diámetro) en sus extremos, que se dividen en dos plaquetas individuales después de un evento de abscisión (Figura 6, etapa 6; Thon y col., 2010).

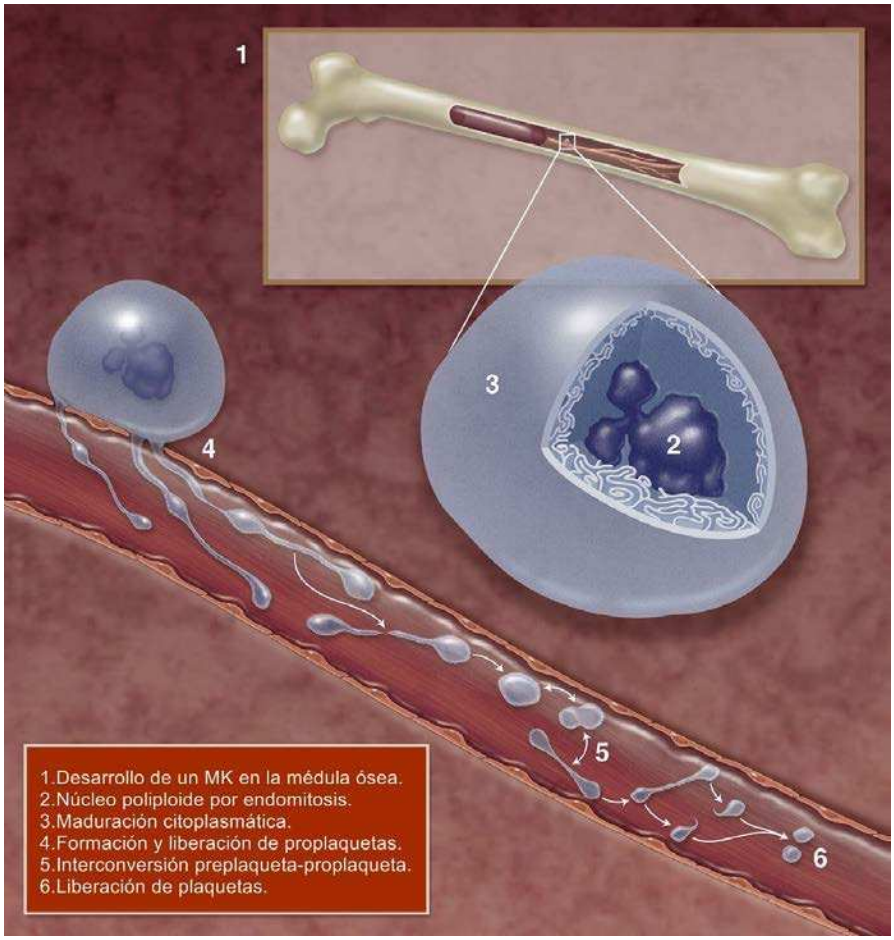


Figura 6. Esquema de la producción de plaquetas. (1-3) Desarrollo y maduración megacariocítica. (4) Los MK migran al nicho vascular, donde extienden las proplaquetas y las liberan en la luz de los sinusoides vasculares. El MK entero se convierte en pre/proplaquetas, y su núcleo es extruido y fagocitado. (5) Una vez en el torrente sanguíneo, las proplaquetas se interconvierten en preplaquetas. (6) Un evento de fisión crea dos plaquetas de una proplaqueta en forma de mancuerna. Adaptada de Machlus e Italiano (2013).

La conversión de pre- a proplaqueta apoya un modelo en el cual las preplaquetas circulares son liberadas en la sangre, rápidamente y espontáneamente se convierten en proplaquetas con forma de mancuerna, y experimentan rápidas rondas de abscisión que dan lugar a plaquetas maduras. Alternativamente, las preplaquetas pueden quedar atrapadas en los microcapilares de la médula ósea, el pulmón o el bazo, donde las fuerzas de flujo intravasculares impulsan la producción de plaquetas. El hallazgo de recuentos plaquetarios más altos en los vasos postpulmonares sugiere que el pulmón podría ser un sitio de formación terminal de plaquetas (Howell y Donahue, 1937). Además, un estudio en ratas reveló que el daño pulmonar puede reducir la cantidad de plaquetas circulantes, lo que indica que los pulmones juegan un papel activo en la regulación de la formación de plaquetas (Xiao y col., 2006).

1.1.5. Glicoproteínas del linaje megacariocítico como moduladoras de la trombopoyesis

Los MKs cultivados *in vitro* en un medio libre de proteínas de matriz pueden formar proplaquetas, lo que sugiere que la interacción directa con el ambiente medular no es estrictamente necesaria para que ocurra la trombopoyesis. Sin embargo, la eficiencia de la producción de plaquetas en cultivo es menor a la observada *in vivo*, sugiriendo que el microambiente de médula ósea desempeña un papel importante al estimular la formación y liberación de plaquetas.

Un creciente número de estudios avalan la idea de que la interacción dinámica de los MKs con las diferentes proteínas de la matriz extracelular en la médula ósea induce su maduración en sitios específicos. Esto es importante para permitir que los MKs se desarrollen primero a partir de las células madres hematopoyéticas y luego migren al nicho vascular antes de iniciar el proceso de formación de proplaquetas. El colágeno de tipo I es el componente más abundante del nicho osteoblástico (Reddi y col., 1977) y su unión a los MKs a través de la GPIa-IIa inhibe la formación de proplaquetas al regular el ensamblaje de las fibras de estrés (Sabri y col., 2004, 2006, Zou y col., 2009). Esto sugiere que, en condiciones fisiológicas, el colágeno de tipo I presente en el nicho osteoblástico suprime la trombopoyesis mientras permite la diferenciación y maduración de los MKs (Arai y Suda, 2007; Pallotta y col., 2009).

El nicho vascular está compuesto por proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno de tipo IV, la fibronectina, el fibrinógeno y el factor von Willebrand, que junto con quimioatractantes solubles, interactúan con los MKs permitiendo que se trasladen

a un microambiente permisivo para las etapas tardías de la maduración megacariocítica y la formación de proplaquetas.

El fibrinógeno es una proteína extracelular de los sinusoides medulares que estimula la trombopoyesis como demuestra el aumento significativo de proplaquetas cuando MKs de aspirados de médula ósea se cultivan sobre fibrinógeno (Larson y Watson, 2006). Se cree que el mecanismo subyacente a este efecto es la unión del fibrinógeno con su receptor en la membrana del MK, la GPIIb-IIIa (Eto y col., 2002; Larson y Watson, 2006). Por otra parte, la GPIIb-IIIa en sí misma podría ser importante para la liberación de las proplaquetas como demuestra un estudio en el que antagonistas de esta glicoproteína, así como anticuerpos dirigidos contra la subunidad IIb, inhiben la formación de proplaquetas cuando se añaden a MKs en cultivo (Takahashi y col., 1999). Además, Ghevaert y colaboradores (2008) describieron una familia portadora de una mutación (D723H) en el gen que codifica para la subunidad IIIa que causa una activación parcial de la misma, dando como resultado una anormal generación de proplaquetas y un fenotipo de macrotrombocitopenia. Por otro lado, los pacientes con trombastenia de Glanzmann, una enfermedad caracterizada por la ausencia parcial o total de la GPIIb-IIIa, tienen un nivel normal de plaquetas circulantes (Caen y col., 1966). Estos resultados sugieren que la GPIIb-IIIa es importante, pero no necesaria, para la formación de proplaquetas.

A diferencia de los pacientes con trombastenia de Glanzmann, los pacientes que sufren del síndrome de Bernard-Soulier presentan trombocitopenia con plaquetas gigantes y alteraciones funcionales consistentes en un defecto de la adhesión de plaquetas al subendotelio y reducción de la agregación plaquetaria (Ware y col., 1993). Este síndrome está ligado a lesiones genéticas del complejo glicoproteico Ib-IX-V que contiene el sitio de unión del factor von Willebrand (FvW). La unión de FvW al complejo GPIb-IX-V es fundamental para la adhesión de las plaquetas al endotelio (Geddis y Kaushansky, 2004). El hecho de que la porción citosólica de la subunidad Ibα se encuentre unida al citoesqueleto a través de la filamina propone que la GPIb-IX-V influiría en el correcto remodelamiento citoesquelético necesario para la formación eficiente de proplaquetas. En este sentido, un estudio realizado en un modelo murino de síndrome de Bernard-Soulier demuestra anomalías morfológicas en la formación de procesos proplaquetarios tales como aumento en el grosor y en el tamaño de los extremos de las proplaquetas (Strassel, 2009). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que anticuerpos monoclonales dirigidos contra la GPIb-IX-V inhiben fuertemente la producción de proplaquetas y que los MK derivados de pacientes con síndrome de Bernard-Soulier no extienden las proplaquetas *in vitro* (Nomura y col., 1991; Takahashi y col., 1999, Balduini y col. 2011). Estas evidencias sugieren que un

mecanismo subyacente a la macrotrombocitopenia observada en los pacientes con síndrome de Bernard-Soulier, podría ser la formación defectuosa de proplaquetas producto de las mutaciones en los genes de GPIb-IX-V.

1.2. Trombocitopenia autoinmune o trombocitopenia inmune

El término "trombocitopenia inmune" es una abreviatura para trombocitopenia inmune primaria, previamente conocida como púrpura trombocitopénica idiopática. Constituye un desorden autoinmune que tradicionalmente fue considerado una enfermedad debida a la destrucción periférica de plaquetas mediada por autoanticuerpos. Actualmente se sabe que el mecanismo fisiopatológico principal es una desregulación del sistema inmune que da lugar a una respuesta tanto celular como humoral contra antígenos plaquetarios (McKenzie y col., 2013; Nishimoto y Kuwana, 2013; Semple, 2013; Ji y col., 2014). Se la define como una trombocitopenia aislada (recuento plaquetario en sangre periférica menor a $100x10^9$/L) en ausencia de otras causas, o desórdenes, que puedan estar asociadas a trombocitopenia (Rodeghiero y col., 2009).

En una reunión de expertos internacionales (Rodeghiero y col., 2009), se realizó una estandarización de la terminología para definir a la trombocitopenia inmune. Se decidió evitar el término "idiopática" y reemplazarlo por "inmune", para enfatizar el mecanismo subyacente a esta enfermedad y, además, elegir "primaria" (en oposición a idiopática) a modo de indicar la ausencia de una causa subyacente o iniciadora obvia. El término "púrpura" se descartó debido a que los signos de sangrado son mínimos en una gran proporción de casos (Frederiksen y col., 1999; Neylon y col., 2003; Stasi y col., 2008b). Aún cuando el acrónimo "PTI" hace referencia a "Púrpura Trombocitopénica Idiopática", éste se continúa utilizando debido a que está muy sólidamente arraigado en los usos y prácticas médicas.

1.2.1. Incidencia de PTI

Estudios epidemiológicos recientes han modificado la visión tradicional respecto de que PTI es una enfermedad que afecta predominantemente a mujeres jóvenes. En la actualidad se sabe que la PTI se vuelve más prevalente a edad avanzada, y que mientras la incidencia de PTI es mayor en mujeres jóvenes que en hombres jóvenes, no existe un género preponderante en individuos mayores (Frederiksen y Schmidt,

1999; Neylon y col., 2003; Schoonen y col., 2009). En Argentina, se han comunicado incidencias de 1,9 a 6,4 casos/100.000 personas/año en niños y de 3,3 a 10 casos/100.000 personas/año en adultos.

Un punto importante a considerar respecto a los datos que se pueden encontrar en la bibliografía es que los estudios epidemiológicos de PTI varían dependiendo del país, ciudad o incluso del laboratorio que realiza el estudio. Puede haber un gran número de casos asintomáticos que no son diagnosticados, al mismo tiempo que podría existir un sesgo hacia la mayor detección de PTI en mujeres debido a la realización de análisis de sangre de rutina durante el embarazo.

1.2.2. Diagnóstico y clínica de PTI

La PTI es un desorden autoinmune adquirido caracterizado por una trombocitopenia aislada en ausencia de otras condiciones causantes de trombocitopenia, como infecciones, otros desórdenes autoinmunes, drogas, causas hereditarias, etc. Por este motivo se la considera una enfermedad de diagnóstico por exclusión y, de acuerdo a criterios de temporalidad PTI puede ser “de reciente diagnóstico” (menos de 3 meses desde el diagnóstico), “persistente” (3-12 meses) o “crónica” (más de 12 meses).

En una actualización mundial sobre PTI (Rodeghiero y col., 2009) se estableció un recuento plaquetario inferior a $100x10^9$/L como el nuevo umbral para su diagnóstico. Este umbral fue preferido al más comúnmente nivel utilizado, de menos de $150x10^9$/L, en base a un análisis prospectivo de una cohorte de sujetos sanos con un recuento plaquetario entre 100 y $150x10^9$/L, cuyos resultados mostraban que la probabilidad de que en 10 años desarrollen una trombocitopenia más severa (recuentos plaquetarios persistentes por debajo de $100x10^9$/L) era sólo del 6,9% (intervalo de confianza del 95%) (Stasi y col., 2006). Incluso en algunas poblaciones no occidentales, valores de recuentos plaquetarios entre 100 y $150x10^9$/L son frecuentes en personas aparentemente sanas (Bain, 1996; Lugada y col., 2004; Adibi col., 2007). Además, el nuevo límite de corte evita la inclusión de la mayoría de las mujeres con trombocitopenia asociada al embarazo, un fenómeno fisiológico bien conocido que no requiere seguimiento específico en ausencia de rasgos clínicos adicionales (Burrows y Kelton, 1988).

Los pacientes con PTI pediátricos y adultos son bastante diferentes en términos de la fisiopatología subyacente y de las características clínicas. En niños, la PTI puede seguir a una infección viral o inmunización. En la mayoría de los niños la enfermedad

remite espontáneamente dentro de los 6 meses con una ligera necesidad de tratamiento médico. Alrededor del 15% de los niños desarrollarán PTI crónica. En la forma adulta de la enfermedad usualmente no hay pródromo. En su lugar, los pacientes podrían notar un incremento de moretones, o petequias. En muchos casos la PTI en adultos se detecta por casualidad, cuando el paciente debe realizarse un análisis completo de sangre por otros motivos.

La PTI en adultos es extremadamente heterogénea. Algunos pacientes no tienen manifestaciones clínicas relacionadas a su trombocitopenia aún con recuentos plaquetarios muy bajos, mientras que otros pueden tener sangrado desde el comienzo de la enfermedad. En la mayoría de los casos, las manifestaciones clínicas comprenden solamente hemorragias localizadas en la piel o en las membranas mucosas que usualmente tiene baja o ninguna consecuencia (petequias, púrpuras, equimosis, epistaxis); más raramente, puede asociarse a eventos de sangrado severo como hemorragias intracraneales. Esto contrasta con lo que se observa en la trombocitopenia producida por quimioterapia o falla medular, en donde las hemorragias severas pueden ser más frecuentes (Harker y Slichter, 1972; Kuter, 2015). La mayoría de los pacientes con PTI son asintomáticos cuando el recuento plaquetario es mayor de $50x10^9$/L (Stasi et al, 2008b). Un estudio europeo de más de 1 año de seguimiento mostró que el 40% de los pacientes no tenía sangrado a pesar de su bajo recuento plaquetario y no necesitó tratamiento alguno (Rodeghiero y col., 2010). Cabe destacar que varios factores contribuyen al riesgo de sangrado, incluyendo la edad, las co-morbilidades, la medicación, la historia de sangrado previa y otros factores aún no identificados. Otro de los aspectos en los que se observa heterogeneidad es en la detección de los autoanticuerpos que varía entre el 48 al 80% de los pacientes dependiendo de la población analizada. Por este motivo, la detección de los autoanticuerpos no se encuentra dentro de los criterios diagnósticos en PTI (Fondevila y col., 2015).

1.2.3. Tratamiento de PTI

El principal objetivo del tratamiento es lograr el aumento del recuento plaquetario hasta niveles que se consideren hemostáticos para cada paciente basado en un seguimiento caso por caso (Provan, 2009). La intención no es normalizar el recuento de plaquetas. En general, el tratamiento es raramente necesario cuando el número de plaquetas se encuentra por encima de $20x10^9$/L. Para pacientes con recuentos menores a $20x10^9$/L el tratamiento podría ser requerido, pero dependerá de una

completa evaluación del paciente incluyendo estilo de vida, ocupación, historia de sangrado, co-morbilidades y otros factores.

El informe del Consenso Internacional sobre la investigación y manejo de PTI (Provan y col., 2010), así como las guías de diagnóstico y tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología 2015 a nivel nacional (Fondevila y col., 2015), incluyen un espectro de posibilidades terapéuticas que poseen mecanismos de acción muy diferentes. Los tratamientos de primera línea están dirigidos a la inmunomodulación y/o inmunosupresión e incluyen la utilización de corticoides (Kitchens y Pendergast, 1986), inmunoglobulina endovenosa (Ig EV) (Newland y col., 1983, 1984), e inmunoglobulina anti D (anti-D) (Cooper, 2009). Si un paciente no responde al tratamiento de primera línea, o sufre recaídas después de una respuesta, puede ser necesario introducir un tratamiento de segunda línea. Esto incluye la rotación de medicamentos utilizados en el tratamiento de primera línea, la administración de otros inmunosupresores como azatioprina, ciclosporina A, ciclofosfamida y el esteroide sintético danazol, el tratamiento con rituximab (un anticuerpo dirigido contra el CD20) y la esplenectomía. En la última década se ha desarrollado una terapia dirigida a estimular la producción de MKs, y por consiguiente de plaquetas, mediante la utilización de agonistas del receptor de trombopoyetina. En este sentido, se han incorporado al espectro de drogas para el tratamiento de PTI, un péptido sintético análogo a la trombopoyetina, el romiplostim, y un compuesto aromático que se une a la región transmembrana del c-Mpl denominado eltrombopag (Kuter, 2007; Kuter y col., 2008; Molineux y Newland, 2010; Bussel y col., 2012; Scully y col., 2012; Sharma y col., 2012).

Los tratamientos también pueden clasificarse entre los que se dan sólo una vez (o para un solo curso) y están destinados a inducir una remisión a largo plazo (esplenectomía, rituximab), y aquellos que necesitan administración continua o crónica (corticoides, agentes inmunosupresores, agonistas del receptor de trombopoyetina). Dependiendo del contexto clínico, la esplenectomía se aplazará en pacientes durante al menos 6 meses desde el diagnóstico. Esto puede deberse a la preferencia del paciente o a la presencia de otras co-morbilidades activas y al entendimiento de que puede ocurrir una mejoría espontánea o una remisión tardía de 6 a 12 meses después del diagnóstico; de hecho, algunos pacientes pueden remitir espontáneamente incluso años después del diagnóstico.

1.2.4. Fisiopatología y mecanismos subyacentes de PTI

En 1735, el médico alemán Werlhof publicó un caso de una paciente de 16 años con sangrado muco-cutáneo posteriormente a una enfermedad infecciosa que presentaba la clásica descripción clínica de PTI. Werlhof definió su condición como "morbus maculosus haemorrhagicus" la cual fue subsecuentemente denominada "enfermedad de Werlhof", nombre que algunos médicos aún siguen utilizando en lugar de "PTI". Luego de que en 1881 Bizzozero demostrara la existencia de las plaquetas como una línea celular independiente especializada en la función hemostática, Denys (1887) descubrió que el número de éstas disminuía durante la fase activa de la púrpura (lesiones rojas-púrpuras producidas por sangrado en la dermis o en los tejidos subcutáneos) y se incrementaba cuando las hemorragias cesaban. Los mecanismos responsables de la trombocitopenia en la enfermedad de Werlhof pronto se volvieron un tema controversial. Luego de que Wright (1906) demostrara que las plaquetas eran fragmentos de los MKs, el fisiólogo Ernest Frank postuló que la "trombocitopenia esencial" resultaba de una supresión tóxica sobre los MKs por parte de una sustancia producida en el bazo (Frank, 1915). Un año más tarde, Paul Kaznelson propuso que la trombocitopenia esencial resultaba de una elevada destrucción de las plaquetas en el bazo al describir un marcado incremento en el recuento plaquetario y una resolución de la púrpura en una paciente de 36 años de edad con un historial consistente con la actual definición de PTI luego de ser sometida a una esplenectomía (Kaznelson, 1916). En una publicación de 1946, Dameshek y Miller reportaron que, mientras el número de plaquetas en sangre periférica se encontraba consistentemente disminuido en PTI, el número de MKs era normal o aumentado, pero sólo un tercio, o menos, de los MKs mostraban evidencias de producción plaquetaria.

Teniendo en cuenta los resultados publicados en la literatura hasta ese momento, Harrington y Hollingsworth plantearon la hipótesis de la existencia de un factor antiplaquetario humoral como el responsable de la trombocitopenia en los pacientes que sufrían PTI. Para ponerla a prueba, Harrington recibió sangre de una paciente joven con trombocitopenia persistente a una esplenectomía. El recuento plaquetario de Harrington cayó estrepitosamente a $10x10^9$/L y durante los siguientes 3 días experimentó petequias muco-cutáneas, sangrado gingival, epistaxis y sangrado rectal hasta que su recuento plaquetario se normalizó en el transcurso de una semana. Experimentos similares en otros voluntarios confirmaron su descubrimiento original y los llevaron a concluir que algún factor en el plasma de los pacientes con PTI estaba destruyendo las plaquetas (Harrington y col., 1951). A su vez, la médula ósea de Harrington, y de los demás voluntarios, mostró un incremento en el número de MKs

durante la trombocitopenia. El experimento de Harrington y Hollingsworth demostró que la PTI se caracteriza por una reducida supervivencia de las plaquetas debido a un factor humoral. Harrington luego proveería evidencia de que este factor se encontraba en la fracción de gammaglobulinas, al tiempo que Evans y colaboradores (1951) sugirieron que se trataba de un anticuerpo antiplaquetario. Los resultados obtenidos por Harrington y Hollingsworth abrieron el debate acerca de los mecanismos causantes de la trombocitopenia en PTI: destrucción periférica de plaquetas versus impedimento en la producción plaquetaria.

Estudios realizados por Pisciotta y colaboradores (1953) utilizando microscopía de contraste de fases confirmaron los descubrimientos de Dameshek y Miller al describir varias anormalidades en los MKs en PTI. Hipotetizaron que los MKs sufren un defecto en la maduración, que existirían anormalidades en la formación y liberación de plaquetas y que una aglutinina plaquetaria presente en PTI era igualmente capaz de atacar a los MKs así como a las plaquetas que los rodean y nacen de ellos.

Las investigaciones de Shulman y colaboradores en el año 1965 establecieron que el factor en el plasma de pacientes con PTI estaba asociado a las inmunoglobulinas G (IgG), y que el grado de trombocitopenia en sujetos sanos sometidos a la inoculación de plasma de PTI dependía de la dosis de plasma transfundido. La naturaleza de las IgGs productoras de trombocitopenia fue eventualmente descripta en 1982 por los experimentos de van Leeuwen y colaboradores (1982). Ellos notaron que los sueros de eluídos plaquetarios de pacientes con PTI se unían a plaquetas normales pero sólo un cuarto de ellos lo hacía a plaquetas de pacientes con trombastenia de Glanzmann. De esta manera, especularon que los pacientes con PTI producen anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína (GP) IIb o la GPIIIa debido a que los pacientes trombasténicos carecen de estas proteínas. A partir de estos descubrimientos, varios laboratorios han proveído evidencia sobre la presencia de autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa y otros antígenos plaquetarios en PTI (Woods y col. 1984b, b; Kiefel y col. 1987; McMillan y col. 1987).

Actualmente se sabe que estos autoanticuerpos son con frecuencia de la subclase IgG1, o una combinación de otras subclases de IgG, (Chan y col., 2003) y están dirigidos principalmente contra el receptor de fibrinógeno, la GPIIb-IIIa, y contra el receptor del FvW, la GPIb-IX-V (Woods y col., 1984a, 1984b; McMillan y col. 1987; Beardsley y Ertem, 1998), y en menor medida reaccionan con los receptores de colágeno, las GPs Ia-IIa, IV y VI (He y col., 1994; Boylan y col., 2004) (Figura 7). Se considera que la fagocitosis de las plaquetas unidas a autoanticuerpos constituye el principal mecanismo patogénico por el cual estas moléculas inducen trombocitopenia. Las plaquetas recubiertas con anticuerpos son eliminadas principalmente en el bazo y

el hígado por los macrófagos del sistema retículo-endotelial a través de los receptores Fcγ (Nieswandt y col., 2000; Webster y col, 2006). Recientemente se ha descubierto que los anticuerpos anti-GPIbα inducen la desialinización de la GPIbα, lo que conduce al *clearence* de las plaquetas a través de los receptores Ashwell-Morell y MAC-1 en los hepatocitos y en los macrófagos del hígado (van Der Wal y col., 2012; Li y col., 2015). A su vez, el daño plaquetario mediado por la activación del complemento en las plaquetas ligadas a anticuerpos (McMillan, 2007; Najaoui y col., 2012) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos parecen tener algún papel en la trombocitopenia de PTI (Goette y col., 2016).

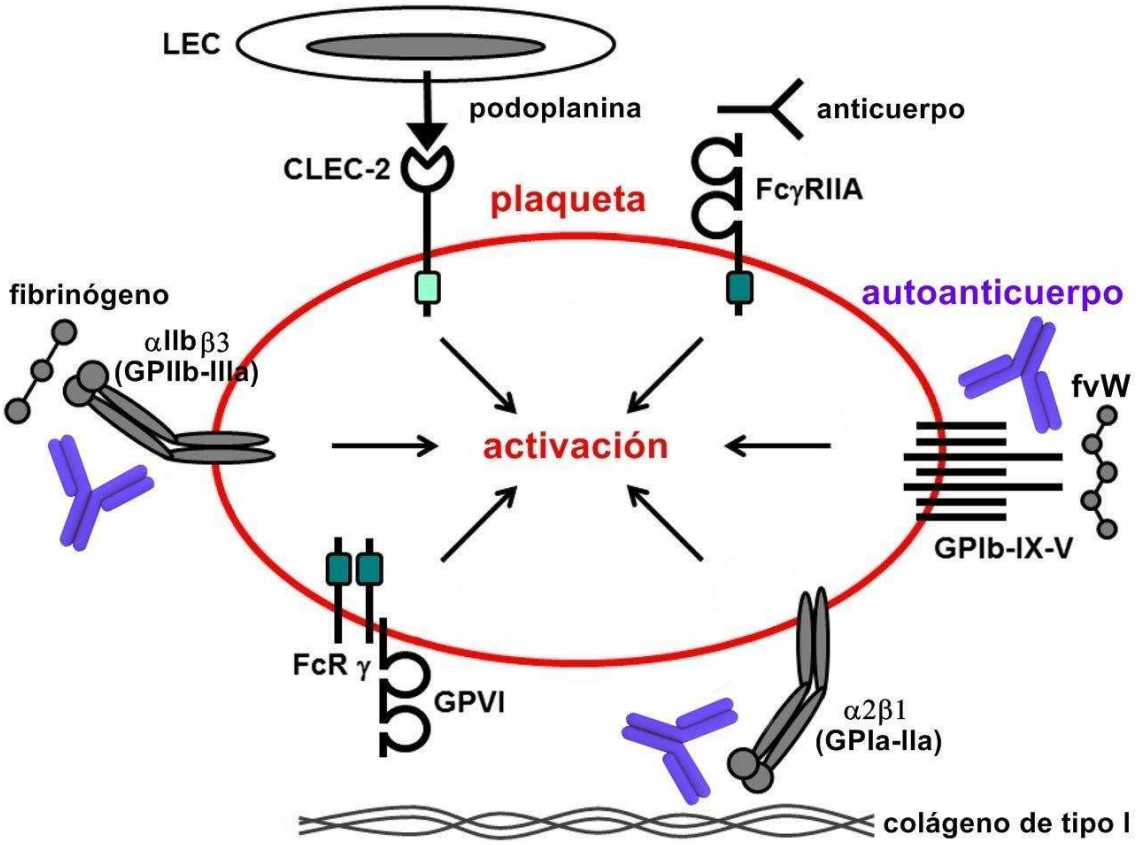


Figura 7. Los autoanticuerpos de PTI están dirigidos contra receptores de la membrana plaquetaria. Los principales blancos de los autoanticuerpos de PTI (dibujados en azul) son el receptor del factor de von Willebrand (fvW), la glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) y las integrinas αIIbβ3 (o GPIIb-IIIa), receptor del fibrinógeno, y α2β1 (o GPIa-IIa), receptor del colágeno de tipo I. Adaptada de Senis y colaboradores (2014), con modificaciones.

Utilizando plaquetas marcadas con ^{59}Cr se demostró una reducción de la sobrevida y un aumento de cuatro a nueve veces de la tasa de producción plaquetaria en pacientes con PTI severa (Harker y Finch, 1969; Harker y col., 1970; Branehog y col., 1974). Con la introducción del ^{111}In, un radioisótopo con características más adecuadas para el estudio de la cinética y distribución plaquetaria, se volvió evidente

que existía una considerable heterogeneidad en el recambio de plaquetas en la población de pacientes con PTI, con una proporción sustancial de pacientes que tenían producción plaquetaria normal aún cuando la vida media de las plaquetas estaba significativamente reducida (Stoll y col., 1985; Heyns y col., 1986; Ballem y col., 1987). Si la destrucción plaquetaria fuera el único mecanismo causante de trombocitopenia, entonces se esperaría que la producción plaquetaria estuviese aumentada para compensar la disminución del recuento de plaquetas. Una vez más se propuso que la trombocitopenia no era únicamente el resultado de la destrucción plaquetaria sino también de un daño sobre los MKs mediado por los autoanticuerpos. Estudios realizados a comienzos de los años 80 apoyaron esta hipótesis al demostrar que los anticuerpos antiplaquetarios se unían a los MKs (Rabellino y col., 1981; Vinci y col., 1984). Incluso antes de dichas observaciones, McMillan y colaboradores (1978) reportaron que las IgG producidas *in vitro* por células del bazo de pacientes con PTI se unían a MKs mientras que las IgG producidas por células del bazo de individuos sanos no lo hacían. Posteriores estudios *in vitro* apoyaron la idea de que los autoanticuerpos de PTI suprimen la producción y maduración megacariocítica (Chang y col., 2003; McMillan y col., 2004).

Estudios de microscopía electrónica han aclarado algunos aspectos del daño inducido por los autoanticuerpos sobre los MKs de la médula ósea de pacientes con PTI. Extensas anormalidades se describieron en un porcentaje significativo de los MKs de PTI en todas las etapas de maduración (Stahl y col., 1986; Houwerzijl y col., 2004). El más reciente de estos estudios (Houwerzijl y col., 2004) describió rasgos característicos de apoptosis no clásica, incluyendo hinchazón mitocondrial con citoplasma vacuolado, distensión del sistema de demarcación de membranas, y condensación de la cromatina nuclear. Se observaron cambios para-apoptóticos en MKs obtenidos de células CD34+ cultivadas con plasma de PTI, sugiriendo que los autoanticuerpos podrían iniciar la cascada de muerte celular programada. Sin embargo, el hecho de que Li y colaboradores (2007) describieran que los MKs de los pacientes con PTI cultivados junto con sus propias células mononucleares tengan menor apoptosis que su contraparte normal, demuestra que los resultados publicados no son concluyentes.

Anormalidades en las células T de PTI han sido consistentemente reportadas por un solo grupo desde los principios de los años 90 (Semple y col., 1991; Semple y Freedman, 1994; Semple y col., 1996). Teniendo en cuenta que las células T de sangre periférica de los pacientes con PTI podrían secretar interleuquina (IL)-2 por estimulación con plaquetas, Semple y colaboradores (1991) sugirieron que este desorden podría ser el resultado de un defecto en las células T “helper” (Th) que

podría dirigir a células B autorreactivas a diferenciarse y secretar autoanticuerpos de tipo IgG. Contribuciones de otros grupos han expandido significativamente nuestro entendimiento sobre la participación de varios subtipos de linfocitos en la patogénesis de PTI (Filion y col., 1995; Shimomura y col., 1996; Kuwana y col., 1998, 2001; Fogarty y col., 2003).

Olsson y colaboradores (2003) describieron que la trombocitopenia observada en pacientes con PTI carentes de autoanticuerpos antiplaquetarios, podía estar mediada por linfocitos T citotóxicos (Tc). Los pacientes con enfermedad activa tenían linfocitos Tc en sangre periférica que podían unirse a las plaquetas *in vitro* y causar su lisis, mientras que los pacientes en remisión tenían linfocitos Tc de muy baja reactividad. Este mismo grupo sugirió que la PTI crónica podría ser una enfermedad caracterizada por activación aumentada de células T debido a un defecto en los linfocitos T reguladores (Tregs) dentro de la médula ósea.

Actualmente, la PTI crónica es considerada una enfermedad Th1, caracterizada por la acumulación oligoclonal de células Th (Shimomura y col., 1996; Fogarty y col., 2003; Stasi y col., 2007). Defectos cuantitativos o cualitativos en los linfocitos Tregs CD4+ CD25+ Foxp3+ podrían tener un rol importante en la pérdida de tolerancia en pacientes con PTI y en la persistencia de la enfermedad (Stasi y col., 2008a; Yu y col., 2008), aunque los defectos precisos que conducen a esta perdida de tolerancia son desconocidos. Los pacientes con un estado activo de la enfermedad tienen típicamente un perfil de citoquinas que está sesgado hacia un patrón de activación de CD4 +, Th0/Th1 con aumento de IL-2 e IFNγ, reducción de IL-4 e IL-10 y disminución de TNF-β que tiende a normalizar cuando los pacientes están en remisión (Klinger y Jelkmann, 2001; Stasi y col., 2010; Olson y col., 2013). Este patrón de citoquinas promueve la diferenciación de las células B autorreactivas en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos y el desarrollo de linfocitos Tc (Klinger y Jelkmann, 2001; Stasi y col., 2010; Olson y col., 2013), pero no puede explicar su ontogenia y especificidad hacia las plaquetas. A su vez, varios grupos han descripto una alteración en el nivel circulante de IL- 17, 22 y 27, aunque la creciente cantidad de publicaciónes al respecto muestra resultados poco categóricos (Camargos Rocha y col., 2011; Cao y col., 2011; Liu y col., 2011; Li y col., 2012). Además del papel regulador desempeñado por los linfocitos Tregs en la tolerancia inmune, hay evidencia reciente de un nuevo subconjunto de células reguladoras inmunes periféricas conocidas como células B reguladoras (Bregs), asociadas con PTI (Li y col., 2012; Semple, 2012). Linfocitos Bregs CD19 + CD24hi CD38hi promueven la tolerancia periférica mediante la producción de IL-10, induciendo así el reclutamiento y/o diferenciación de linfocitos Tregs y la reducción de la función de las células T CD4+ (Blair y col., 2010; Mauri y

Bosma, 2012). Este nuevo hallazgo relativo a la función de las células Breg en PTI se suma a la complejidad de la inmunopatogénesis de la enfermedad.

En resumen, los estudios realizados hasta el presente demuestran que la disminución en el recuento plaquetario y las alteraciones de los MKs observadas en PTI son la consecuencia de la pérdida de la tolerancia inmunológica, lo que desencadena tanto una respuesta inmune celular como la producción de autoanticuerpos dirigidos hacia antígenos plaquetarios propios (Figura 8).

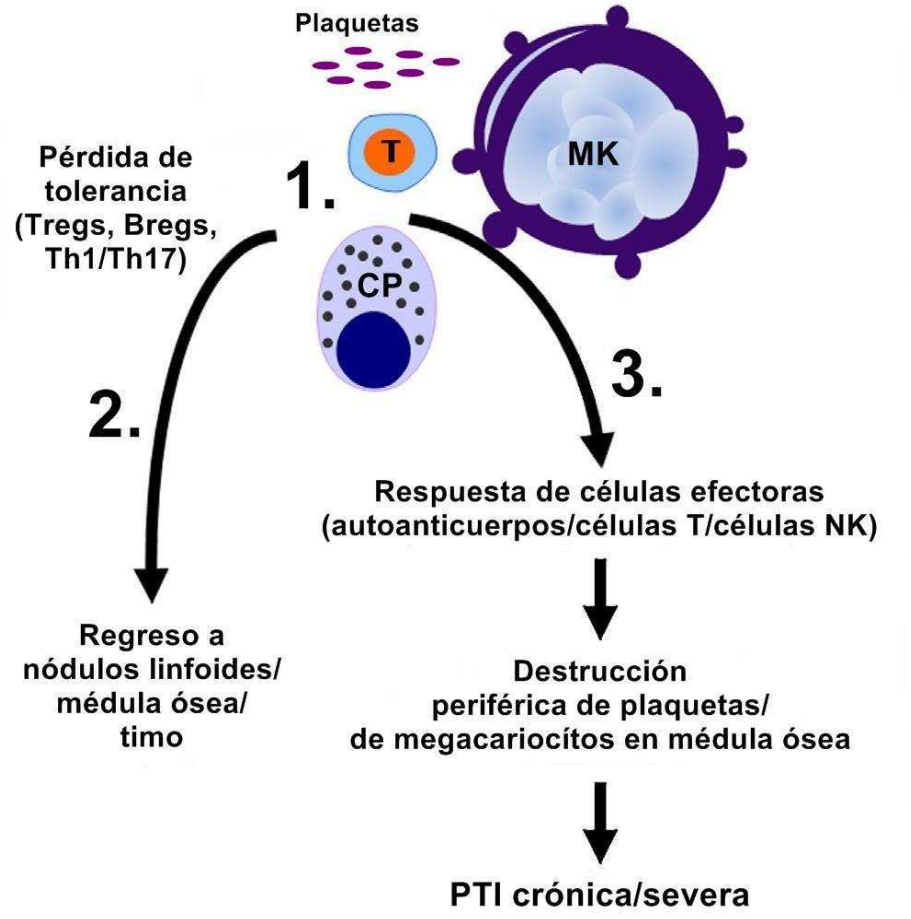


Figura 8. Vías potenciales que contribuyen a la inmunopatogénesis de PTI. **1.** Algunos niños y la mayoría de los adultos desarrollan PTI crónica en la cual una pérdida de tolerancia permite que las células T y B autorreactivas proliferen y generen inmunidad antiplaquetaria. Estas alteraciones pueden ser la consecuencia de una infección no identificada, una activación génica relacionada con el estrés o polimorfismos que inclinan al sistema inmunológico hacia la expansión de un repertorio autorreactivo. **2.** Los linfocitos autoreactivos pueden albergarse en tejidos linfoides donde perpetúan funciones efectoras autorreactivas. **3.** En última instancia, las diversas respuestas de células efectoras conducen a la destrucción periférica de plaquetas y/o a la inhibición/destrucción de los MKs. MK, megacariocito; T, linfocito T; CP, célula plasmática. Adaptada de Cines y colaboradores (2014), con modificaciones.

Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

Mientras que el aumento de la destrucción plaquetaria, producto de la unión de los autoanticuerpos a antígenos específicos del linaje, es considerado la principal causa de la trombocitopenia en PTI, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos descubrimientos que exponen la complejidad de este desorden inmunológico.

Entre estos descubrimientos, se ha demostrado que la diferenciación y la maduración *in vitro* de las células a partir de las cuales se originan las plaquetas, se encuentran afectadas en presencia de plasmas de PTI. Este defecto en la megacariopoyesis sería provocado por los autoanticuerpos anti-plaquetarios y es propuesto como un factor contribuyente a la disminución de la cantidad de plaquetas en circulación. Sin embargo, el número de megacariocitos en la médula ósea de pacientes con en esta enfermedad suele ser normal o estar aumentado. La etapa final del desarrollo de estas células, denominada trombopoyesis, constituye un proceso celular único en el que, a partir del citoplasma megacariocítico, se ensamblan los precursores plaquetarios y se liberan las plaquetas nacientes. Esta etapa no ha sido explorada en la PTI.

Teniendo en cuenta que las glicoproteínas específicas del linaje cumplen roles fundamentales no solo para el funcionamiento general del megacariocito sino también durante el proceso de trombopoyesis, y que, por otra parte, varias de estas glicoproteínas son blancos antigénicos de los autoanticuerpos de PTI, se propone la ***primera hipótesis*** de este trabajo:

> *Los plasmas de PTI inducen alteraciones en la trombopoyesis. Los autoanticuerpos dirigidos contra determinados antígenos plaquetarios serían los responsables de dichas alteraciones.*

El rol de la apoptosis de los megacariocitos en la trombocitopenia inmune continúa siendo un tema de debate. En este sentido, tampoco es clara la relación entre la activación de este mecanismo de muerte celular y la trombopoyesis. Surge entonces la ***segunda hipótesis***:

> *Los autoanticuerpos de PTI generan un patrón anormal de apoptosis en los MKs maduros.*

Considerando que la unión de los autoanticuerpos desencadena la eliminación periférica de las plaquetas por el sistema reticuloendotelial, y que en condiciones fisiológicas los anticuerpos son capaces de provocar una respuesta celular citotóxica, se plantea la ***tercera hipótesis*** de este proyecto:

Los autoanticuerpos de PTI median una respuesta citotóxica sobre MKs maduros.

2.2. Objetivos

Para poner a prueba dichas hipótesis se plantearon objetivos específicos. En el caso de la ***primera hipótesis***, se estableció un objetivo principal del cual se desprendieron varios objetivos particulares

1. Estudiar el efecto de los autoanticuerpos de la PTI en la formación de proplaquetas.

1.a. Evaluar el efecto del plasma de los pacientes con PTI sobre la formación de proplaquetas *in vitro* en MKs normales obtenidos a partir de progenitores hematopoyéticos CD34+ de sangre de cordón umbilical.

1.b. Identificar la especificidad de los autoanticuerpos antiplaquetarios en el plasma de los pacientes con PTI. Investigar si existe alguna relación entre la especificidad de los autoanticuerpos y las alteraciones encontradas en la trombopoyesis.

1.c. Estudiar el efecto de la fracción de IgGs, contiendo los autoanticuerpos, en la trombopoyesis normal.

1.d. Analizar la existencia de alteraciones en la funcionalidad de las GPs de los MKs provocadas por los autoanticuerpos.

1.e. En caso de encontrar un efecto concreto de alguno/s de los autoanticuerpos en la trombopoyesis, estudiar las señales intracelulares involucradas.

2. Estudiar el grado de apoptosis de los MKs maduros normales cultivados en presencia del plasma de pacientes con PTI mediante la evaluación de marcadores de apoptosis como la expresión de fosfatidilserina y la activación de la caspasa 3.

3. Estudiar el efecto del plasma de pacientes con PTI en la apoptosis de MKs maduros normales en presencia de distintos componentes de la fracción mononuclear autóloga normal (células CD3+ y fracción de células mononucleares totales).

Materiales y Metodologías

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos utilizados para la preparación de anticoagulantes y soluciones

Citrato de sodio di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$), sal potásica del Ácido Etilen-Diamino-Tetracético (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2K_2O_8.2H_2O$), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), glucosa ($C_6H_{12}O_6$), fosfato de potasio ($H_2KO_4P$), fosfato de sodio di-hidratado ($HNa_2O_4P.2H_2O$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), fosfato de sodio mono-hidratado ($H_2NaO_4P.H_2O$), Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) ($C_8H_{18}N_2O_4S$), bicarbonato de potasio ($KHCO_3$), cloruro de amonio (NH_4Cl), cloruro de calcio ($CaCl_2$), paraformaldehido (PFA) ($OH(CH_2O)_nH(_{n=8-100})$, tris base ($C_4H_{11}NO_3$), ácido clorhídrico (HCl), NP-40 [$(C_2H_4O)_x \bullet C_{14}H_{22}O$], desoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO_4$), dodecilsulfato sódico (SDS) ($NaC_{12}H_{25}SO_4$), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ($C_7H_7FO_2S$), fluoruro de sodio (NaF), ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), glicina ($C_2H_5NO_2$).

3.1.2. Anticoagulantes

Una vez preparados, los anticoagulantes fueron esterilizados por filtración con un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro para su posterior utilización.

- **Citrato de Sodio** 3,8 %.

- **EDTA** 247 mM.

- **ACD**

  Citrato de sodio di-hidratado 173,4 mM, ácido cítrico 155,4 mM, glucosa 111,1 mM.

- **BAC**

  EDTA 1mM, heparina 50 UI/mL (Laboratorios Richmond, Bs As, Argentina) en PBS.

3.1.3. Soluciones generales

- **Cloruro de calcio** 1 M.

- **PBS (Buffer Fosfato-Salino)** – *pH=7,4*
  Fosfato de potasio 3,2 mM, fosfato de sodio di-hidratado 8,3 mM, cloruro de sodio 145 mM.

- **PBS-EDTA** – *pH=7,4*
  Fosfato de potasio 3,2 mM, fosfato de sodio di-hidratado 8,3 mM, cloruro de sodio 145 mM, EDTA 2 mM.

- **PBS-EDTA-BSA 1 %** – *pH=7,4*
  Se prepara de igual manera que el PBS-EDTA pero com el agregado de albúmina sérica bovina (BSA) apta para cultivo al 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

- **Paraformaldehído** 1 % – *pH=7,3*

- **Solución para lisis de glóbulos rojos** – *pH=7,3*
  EDTA 23,5 µM, bicarbonato de potasio 0,25 mM, cloruro de amonio 42,4 mM.

- **Buffer Tyrode's** – *pH=7,4*
  Cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2 mM, cloruro de calcio 2 mM, cloruro de magnesio 1 mM, fosfato de sodio mono-hidratado 12 mM, glucosa 5,5 mM, HEPES 5 mM.

- **Buffer Tyrode's** – *pH=6,5*
  Se prepara de igual manera que el buffer Tyrode's de pH=7,4 pero se modifica su pH con el agregado de ácido clorhídrico.

- **Buffer de lisis para extracción de proteínas** – *pH=7,4*
  Tris-HCl 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, NP-40 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, fluoruro de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, leupeptina/aprotinina 10 µg/mL (Sigma-Aldrich).

3.1.4. Soluciones para la purificación de las inmunoglobulinas G

- **Buffer de unión** – *pH= 7,4*

  Fosfato de sodio mono-hidratado 20 mM, fosfato de sodio di-hidratado 20 mM.

- **Buffer de elución** – *pH= 2,55*

  Glicina 0,1M llevando a pH con el agregado de ácido clohídrico.

- **Buffer de neutralización** – *pH= 8,8*

  Tris base 1,5M llevando a pH con el agregado de ácido clorhídrico.

3.2. Metodologías

3.2.1. Muestras biológicas

3.2.1.1. Consideraciones éticas

El presente trabajo fue conducido de acuerdo a los principios éticos en investigación biomédica de Helsinki (año 2000), Guía ICH de Buenas Prácticas Clínicas (año 1997) y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en seres humanos CIOMS-OMS, Ginebra, 2003. Así mismo, ha sido aprobado por los Comités de Docencia e Investigación y Ética del Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Comisión de Bioética-Comité de Docencia e Investigación del Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía, Comité de Docencia del Hospital Materno Infantil de San Isidro “Dr. Garlos Gianantonio” y el Comité de Ética en Investigación del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC).

Para obtener progenitores hematopoyéticos CD34+ se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical, previa firma del consentimiento informado, en el Hospital Materno Infantil “Dr. Garlos Gianantonio”. Este procedimiento fue realizado por el equipo del quirófano de obstetricia de dicha institución y no involucra riesgo alguno para la madre ni para el recién nacido. También se utilizaron muestras de sangre periférica de donantes para trasplante alogénico del Servicio de Hematología del CEMIC sede Saavedra. Estos donantes fueron sometidos a un tratamiento previo de

4-5 días con factores de crecimiento hematopoyético para provocar la movilización de los progenitores hematopoyéticos medulares hacia la sangre circulante.

Se extrajeron muestras de sangre de pacientes con PTI atendidos en el Servicio de Hematología Investigación del Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", en la División Hematología del Hospital General de Agudos “José María Ramos Mejía” o en el Servicio de Hematología del CEMIC sede Saavedra. Las muestras de sangre de los controles sanos correspondieron a personal del Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari" y a familiares de pacientes. En cualquier caso, los individuos participaron de manera voluntaria habiendo firmado, previamente, el consentimiento informado.

3.2.1.2. Obtención de progenitores hematopoyéticos CD34+

Se obtuvieron progenitores hematopoyéticos CD34+ a partir de muestras de 50 mL de sangre de cordón umbilical proveniente de partos a término de embarazadas sanas o de muestras de 10 mL de sangre periférica de donantes para trasplante alogénico. En cualquiera de los dos casos, la recolección de las muestras se realizó sobre tubos estériles conteniendo buffer anticoagulante (BAC) estéril en una proporción 1:9.

La muestra de sangre se diluyó adicionando 7 mL de PBS-EDTA 2 mM y se procedió a eliminar el plasma rico en plaquetas a partir de dos centrifugaciones sucesivas de 1000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente. El paquete celular remanente se diluyó al medio con PBS-EDTA 2mM para someterlo a una separación por medio de un gradiente de densidad Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de manera de aislar las células mononucleares, las cuales se diluyeron con PBS-EDTA 2 mM y se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, el precipitado resultante fue incubado en baño termostático a 37º C con solución de lisis y al cabo de 9 minutos se diluyó la muestra con PBS-EDTA 2 mM y se centrifugó a temperatura ambiente por 10 minutos a 1200 rpm. El pellet fue resuspendido en 300 µL de PBS-EDTA-BSA 1 % a 4º C adicionando 100 µL de microesferas magnéticas conjugadas a un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 humana y del reactivo bloqueante del receptor para la región constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) humana (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Finalizada una incubación de 30 minutos a 4º C, las células se diluyeron con 10 mL de PBS-EDTA-BSA 1 % y se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 minutos a 4º C. El precipitado se resuspendió con 500 µL de PBS-EDTA-BSA 1 % a 4º

C para proceder a la separación magnética de las células CD34+ utilizando columnas MiniMACS de separación celular (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se llevó a cabo el recuento de células en cámara de Neubauer adicionando azul de tripán para determinar el porcentaje de viabilidad de las mismas.

3.2.1.3. Obtención de células mononucleares y células CD3+

Se obtuvieron células mononucleares por gradiente de densidad Ficoll-Paque (GE Healthcare) a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos estimulados con factores de crecimiento para trasplante alogénico. Estas células fueron criopreservadas como se describe más adelante, hasta su posterior utilización.

Las células CD3+ se obtuvieron a partir de células mononucleares, descongeladas 24 horas antes, utilizando microesferas magnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD3 humana (Miltenyi Biotec). Considerando que estas células fueron usadas para los experimentos de interacción con MKs maduros, el pasaje por las columnas de separación celular se realizó 48 horas antes de llevar a cabo los co-cultivos.

3.2.1.4. Obtención de plasmas

Se incluyeron 31 pacientes con PTI diagnosticados de acuerdo a los criterios actuales (Rodegheiro y col., 2009). Se extrajeron muestras de sangre periférica de pacientes con un recuento menor a $90x10^5$ plaquetas/µL. Las muestras controles se obtuvieron de voluntarios sanos que no habían ingerido medicamento alguno en los 10 días previos a la extracción.

El volumen de sangre extraída se repartió en 3 tubos con anticoagulantes:

- 10 mL en un tubo conteniendo citrato de sodio 3,8 %,
- 10 mL en un tubo con EDTA 247 mM y
- 2,5 mL en un tubo con EDTA 247 mM.

Las 2 muestras de 10 mL de sangre anticoagulada fueron sometidas, en condiciones de esterilidad, a dos centrifugaciones sucesivas de 15 y 20 minutos a 3000 rpm para obtener el plasma pobre en plaquetas. El plasma producto de la muestra anticoagulada con citrato de sodio fue recalcificado con cloruro de calcio

hasta llegar a una concentración final de 25 nM y se incubó durante 2 horas en baño termostatizado a 37º C. Luego de la remoción de la malla de fibrina producida en la incubación, el plasma recalcificado fue centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos a 4º C para eliminar cualquier resto remanente. El procedimiento de recalcificación se llevó a cabo para eliminar los factores de coagulación presentes en el plasma, que, de no ser removidos, podrían activarse durante la incubación en el medio de cultivo. El plasma obtenido de la muestra anticoagulada con EDTA se utilizó para la determinación de autoanticuerpos. Ambas muestras fueron divididas en alícuotas de 110 µL para conservarlas por separado a -70º C hasta su uso.

El tercer tubo se utilizó para realizar el recuento de plaquetas mediante un contador hematológico automático (SYSMEX, Kobe, Japón). A partir de este estudio se registró el recuento de plaquetas de cada individuo. En la mayoría de los casos, además se realizó un recuento de plaquetas por punción digital, diluyendo 5 µL de sangre en 1 mL de oxalato de amonio 1 %. Las plaquetas diluidas en esta suspensión fueron contadas es cámara de Neubauer.

3.2.2. Congelamiento y descongelamiento de células

En el caso de no cultivar las células inmediatamente luego de su obtención, los progenitores CD34+, o las células mononucleares de sangre periférica, se resuspendieron en 1 mL de una solución de SFB y DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich), ambos al 10 %, a una concentración de entre $1x10^6$ y $1x10^7$/mL. La suspensión celular se colocó a -70º C en criotubos dentro de un recipiente conteniendo isopropanol. El isopropanol permite que el descenso de la temperatura sea gradual evitando la lisis celular. Luego de 24 horas, los tubos congelados se traspasaron a un contenedor de nitrógeno líquido para la criopreservación de las células.

Para descongelar las células, los criotubos se extrajeron del contenedor de nitrógeno líquido y se colocaron directamente en baño termostatizado a 37º C en agitación. Inmediatamente luego de observar que la suspensión celular se encontrase líquida, el contenido de los tubos se trasvasó y diluyó a la mitad secuencialmente con medio de cultivo a 37º C hasta a obtener un volumen final de 30 mL. Finalmente, se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente y el precipitado celular se diluyó nuevamente con medio de cultivo para cultivar las células en las condiciones deseadas.

3.2.3. Cultivos celulares

Los progenitores hematopoyeticos CD34+ obtenidos fueron cultivados en medio de cultivo Stem Span libre de suero (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con glutamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) dentro de una estufa de cultivo celular (Sanyo, Osaka, Japón) con temperatura controlada de 37º C y atmósfera húmeda de 5 % de CO_2 y 95 % de aire. Las células se cultivaron a una concentración de $3x10^5$/mL en placas adecuadas a la cantidad de progenitores obtenidos. Al inicio del cultivo se adicionó 25 ng/mL de trombopoyetina (Miltenyi Biotec) y 10 ng/mL de interleuquina 6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) para estimular la diferenciación celular hacia el linaje megacariocítico. El medio de cultivo fue renovado los días 5, 9 y 12 manteniendo la concentración celular y una concentración final de trombopoyetina de 10 ng/mL.

Las células mononucleares y las células CD3+ se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con glutamina y penicilina/estreptomicina dentro de estufa de cultivo. Ambos tipos celulares se cultivaron durante 48 horas a una concentración de $5x10^5$ células/mL en placas adecuadas a la cantidad obtenida.

3.2.4. Análisis de pureza y madurez de los MKs por citometría de flujo

El día 9 de cultivo se incubaron $2x10^4$ células (dilución máxima: $5x10^5$/mL), durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con anticuerpos anti-CD61 (GPIIIa) conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (clon RUU-PL7F12) (BD Biosciences, San José, CA, EEUU) y anti-CD42b (GPIbα) conjugado con ficoeritrina (PE) (clon HIP1) (BD Biosciences) para determinar la pureza y madurez de los megacariocitos, respectivamente. A continuación, se fijaron las células con paraformaldehido 1 % incubándolas por 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron con el citómetro FACS Calibur de tres canales (BD Biosciences) perteneciente al servicio de citometría del Laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. En cada cultivo se realizaron todos los controles correspondientes para la correcta compensación de las fluorescencias. La determinación de los porcentajes de pureza y madurez se llevó a

cabo utilizando el software WinMDI 2.9 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EEUU).

3.2.5. Identificación de la especificidad de los autoanticuerpos antiplaquetarios presentes en el plasma de los pacientes con PTI

Se utilizaron los kits comerciales PakAuto y PakPlus (GTI Diagnostics Inc., Waukesha, WI, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Mediante la utilización de estos kits de ELISA se pueden detectar anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA dirigidos contra los complejos glicoproteicos IIb-IIIa, Ib-IX-V y Ia-IIa.

3.2.6. Purificación de las inmunoglobulinas G plasmáticas

Se purificaron las fracciones de inmunoglobulinas plasmáticas de 26 plasmas (10 controles y 16 pacientes con PTI) usando un protocolo en batch en condiciones de esterilidad. Se adicionaron 400 µL de plasma a un tubo eppendorf de 1,5 mL de capacidad conteniendo 200 µL de una resina de sefarosa conjugada con proteína G (GE Healthcare) y 400 µL de buffer de unión. La mezcla se mantuvo 1 hora en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a una centrifugación durante 3 minutos a 10000 g a 4º C. El sobrenandante resultante (eluído) fue removido y a la resina precipitada, conteniendo las IgG plasmáticas, se le adicionó 1 mL de buffer de unión para volver a centrifugarla durante 3 minutos a 10000 g a 4º C. Luego de repetir 2 veces el lavado, se agregaron 200 µL de buffer de elución a la resina, se resuspendió por inversión y se centrifugó por 3 minutos a 10000 g a 4º C para desligar las IgGs de la sefarosa para obtener la fracción purificada en el sobrenadante que se traspasó a otro tubo conteniendo 40 µL de buffer de neutralización. Finalmente, la fracción conteniendo las IgG se dializó y concentró en PBS estéril utilizando columnas concentradoras y dializantes (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se sometieron a una corrida electroforética de una dimensión en gel de poliacrilamida al 12 %, tanto en condiciones no reductoras como reductoras, a fin de corroborar la pureza de las inmunoglobulinas obtenidas. Las fracciones de IgG obtenidas se alicuotaron y mantuvieron a 4º C hasta su posterior utilización.

3.2.7. Inmunodepleción de los autoanticuerpos plasmáticos

Para remover los autoanticuerpos antiplaquetarios del plasma de los pacientes con PTI se incubaron los plasmas recalcificados con plaquetas de donantes sanos. Para ello, se obtuvieron 10 mL de sangre periférica con 1,67 mL de anticoagulante ACD que se centrifugaron durante 8 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Se extrajo el plasma rico en plaquetas resultante y se le adicionó prostaglandina E1 (PGE_1) (Sigma-Aldrich) hasta alcanzar una concentración de 20 ng/mL para evitar la activación plaquetaria. Pasados 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó una centrifugación de 1 minuto a 3000 rpm a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos y blancos remanentes. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos para precipitar las plaquetas y lavarlas 3 veces con 1 mL de buffer Tyrode's pH=6,5 con PGE_1 a 2400 rpm por 10 minutos. Las plaquetas lavadas se resuspendieron en buffer Tyrode's pH=7,4 para realizar el recuento plaquetario e incubarlas durante 1 hora a temperatura ambiente con 500 µL del plasma de PTI ($1x10^6$ plaquetas/µL de plasma) adicionando PGE_1. Luego de una centrifugación a 2800 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar las plaquetas, se procedió a realizar una segunda incubación del plasma con plaquetas nuevas en idénticas condiciones. Las plaquetas fueron eliminadas luego de la incubación al centrifugarlas nuevamente a 2800 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma inmunodepletado, que se alicuotó y guardó a -70º C hasta su posterior utilización. La eficiencia de la inmunodepleción se corroboró midiendo los autoanticuerpos con el kit comercial de ELISA mencionado anteriormente. Los plasmas de individuos controles se sometieron al mismo procedimiento.

3.2.8. Recuento de proplaquetas (PPs) en suspensión

Para evaluar el efecto del plasma recalcificado e imnunodepletado de PTI sobre la trombopoyesis, se cultivaron $1x10^4$ MKs maduros (día 13 de cultivo) en presencia de 10 % de muestras de PTI o de controles sanos en placas de cultivo de 96 pocillos. Para estudiar el efecto de las fracciones purificadas de las IgGs, los MKs se cultivaron con 2,5 % de estas muestras, ya que concentraciones mayores resultaron perjudiciales para las células, y se adicionó 5 % de un pool de plasmas controles. Luego de la incubación en estufa de cultivo, se contó el número total de MKs formando PPs bajo microscopio invertido Axiovert 25 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Alemania)

usando un objetivo 32x. Inmediatamente luego, se resuspendió el contenido de cada pocillo y se contaron las células viables (negativas para la coloración de azul de tripán) en cámara de Neubauer. A partir de este dato, se calculó la cantidad de MKs vivos sobre la base de las células CD61+. Se calculó el porcentaje de MKs produciendo PPs como,

% MKs produciendo PPs = MKs produciendo PPs / (células viables x fracción CD61+) x 100

Para definir el tiempo de incubación luego del cual se evaluaría la formación de PPs, se realizaron estudios preliminares de cinética de producción de PPs. Aunque la inhibición sobre la trombopoyesis inducida por las muestras de PTI se observó al cabo de 24 horas, los recuentos finales se llevaron a cabo a las 48 horas debido al mayor porcentaje de PPs observado en los MKs incubados en presencia de los plasmas controles, lo que implicó que el efecto de las muestras de PTI se haga más evidente. Para algunos experimentos, los plasmas de los pacientes se diluyeron con plasmas normales, evaluando su efecto sobre la formación de PPs en función de su concentración.

3.2.9. Inhibición de la formación de PPs sobre colágeno de tipo I

Con el fin de evaluar la inhibición en la formación de PPs inducida por el colágeno de tipo I, los MKs maduros se sembraron en pocillos de placas de cultivo previamente revestidos con colágeno de tipo I 25 µg/mL (amablemente proporcionado por el Profesor Tira y el Doctor Gruppi, de la Universidad de Pavía) como fue descrito previamente (Balduini y col., 2008). Se añadió 10 % de plasma recalcificado, o 2,5 % de la fracción purificada de IgGs de pacientes con PTI portadores de autoanticuerpos anti-GPIa-IIa y anti-GPIIb-IIIa, así como de controles normales, y se incubaron durante 48 horas, después de lo cual se realizó el recuento de PPs. Los resultados sobre el colágeno de tipo I se expresaron en función de aquellos obtenidos en pocillos no recubiertos.

3.2.10. Análisis de las características apoptóticas y morfológicas de MKs y PPs

Para evaluar las características celulares de los MKs y determinar sus estadios madurativos, así como analizar la morfología de las PPs y realizar el recuento de las

mismas sobre fibrinógeno, MKs maduros fueron sembrados en una concentración de $1x10^5$ células/pocillo sobre cubreobjetos de vidrio previamente revestidos con fibrinógeno 100 µg/mL (Merck-Millipore, Milan, Italy; Sigma-Aldrich) (Balduini y col, 2008). Las células fueron incubadas durante 48 horas en estufa de cultivo celular en presencia de 10 % de plasma recalcificado de pacientes con PTI o controles normales. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído 1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con una solución de BSA al 1 % y SFB (suero fetal bovino) al 10 % en PBS durante 1 hora. A continuación, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,2 % durante 6 minutos y se tiñeron con anti-CD61-FITC (clon RUU-PL7F12) (BD Biosciences) durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Con el fin de evaluar la apoptosis en MKs, las muestras se marcaron simultáneamente con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa en conejo (clon D175) (Cell Signaling Technologies Inc., Danvers, MA, EEUU) seguido de una incubación de 1 hora en oscuridad con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con rodamina (Thermo Fisher Scientific). La tinción nuclear se realizó con el reactivo Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) durante 4 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se montaron utilizando el reactivo ProLong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EEUU). Entre cada paso realizado se llevaron a cabo los lavados correspondientes con PBS.

Los preparados se observaron en un microscopio de epi-iluminación Axiostar plus (Carl Zeiss) a través de objetivos de 40x ó 100x con aceite de inmersión de baja fluorescencia. Para la obtención de las imágenes a analizar, se obtuvieron fotografías utilizando una cámara de fotos PowerShot G6 (Canon, Tokio, Japón) incorporada al microscopio. Los MKs fueron categorizados en las etapas de maduración de acuerdo a los criterios morfológicos estándar (Williams y Levine, 1982). Para el análisis de la morfología de las PPs, se contó el número de extensiones proplaquetarias, de puntos de ramificación, de engrosamientos y tips en cada MK. Las mediciones de PPs que comprenden la longitud y el grosor máximo del eje se realizaron con el software de análisis de imágenes VideoTesT-Master Morphology (VideoTesT, St. Petersburg, Rusia). Para la morfología de las PPs, al menos 50 MKs fueron analizados en cada muestra; para la evaluación de la activación de la caspasa 3 y de la condensación de la cromatina, se evaluaron al menos 100 MKs; y para el recuento de PPs sobre fibrinógeno, se contaron al menos 1000 MKs en cada muestra.

3.2.11. Estudios funcionales de las GPs

3.2.11.1. Unión de PAC-1

MKs maduros normales se incubaron con 10 % de plasmas recalcificados de PTI portadores de autoanticuerpos anti-GPIIb-IIIa o de controles normales durante 24 horas a 37º C en estufa de cultivo. Después de la incubación, los MKs se lavaron 2 veces con PBS-EDTA 2mM, y se estimularon con 20 µM de ADP (Helena, Beaumont, TX, EEUU) y epinefrina (Helena), en presencia de PAC-1 conjugado con FITC (un anticuerpo IgM que reconoce el sitio activo de la GPIIb-IIIa) (BD Biosciences) y anti-CD42b-PE (BD Biosciences) durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1 %, se diluyeron en PBS y se adquirieron en citómetro de flujo (BD Biosciencess). La población de MKs se seleccionó como las células positivas para anti-CD42b-PE. La tinción isotópica se determinó utilizando un anticuerpo policlonal IgM de ratón conjugado con FITC (BD Biosciencess). La activación basal de la GPIIb-IIIa se evaluó en MKs no estimulados procesados como se describió anteriormente.

3.2.11.2. Adhesión y spreading de los MKs

MKs maduros normales se sembraron, sobre cubreobjetos de vidrio previamente recubiertos colocados en placas de 24 pocillos, a una concentración de $1x10^5$ células/pocillo con la adición de 10 % de plasma de control o PTI. De acuerdo con el tipo de autoanticuerpo a evaluar, los MKs se incubaron en el substrato correspondiente: fibrinógeno 100 µg/mL para analizar muestras con anticuerpos anti-GPIIb-IIIa, colágeno de tipo I fibrilar 25 µg/mL para evaluar las muestras con anticuerpos anti-GPIa-IIa y Factor von Willebrand (FvW) 10 µg/mL (brindado generosamente por la Doctora Fabiana Alberto, Academia Nacional de Medicina) para estudiar la muestra portadora de anti-GPIb-IX-V. Luego de 16 horas de incubación en estufa de cultivo, se calculó el porcentaje de MKs adheridos a los sustratos por recuento de células en los sobrenadantes de cada muestra utilizando cámaras de Bürker.

Se realizó una tinción inmunofluorescente sobre las células adheridas como se describió más arriba, utilizando un anticuerpo anti-CD61 (clon SZ21) (Immunotech, Marsella, Francia) seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Las muestras se analizaron en un microscopio

fluorescente Olympus BX51 (Olympus, Hamburgo, Alemania) con objetivo de 40x para establecer el porcentaje de MKs en *spreading* contando al menos 150 MKs en 15 campos diferentes elegidos al azar. Se tomaron fotografías representativas. Esta metodología se realizó en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Pavia dirigido por la Dra. Alessandra Balduini.

Para estudiar el efecto de las IgG purificadas sobre la adhesión de los Mks normales, se recubrió el fondo de los pocillos de una placa de cultivo con los sustratos correspondientes y se sembraron $1x10^4$ MKs/pocillo adicionando 2,5 % de las fracciones purificadas de IgGs. El análisis de adhesión se llevó a cabo como se explicó más arriba y en estos casos no se llevó a cabo el estudio de *spreading*.

En los experimentos para evaluar la funcionalidad de la GPIb-IX-V, se adicionó a los cultivos un tetrapéptido sintético de secuencia Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (Sigma-Aldrich) de manera de bloquear el sitio activo de la GPIIb-IIIa, que también reconoce al FvW. Para determinar la concentración a utilizar, se evaluó la unión de PAC-1 a la GPIIb-IIIa por citometría de flujo sobre MKs maduros estimulados con ADP/epinefrina en presencia de distintas concentraciones de RGDS (Figura 9). De acuerdo a estos resultados se consideró que una concentración de 500 µM es suficiente para impedir la unión del FVW a la GPIIb-IIIa.

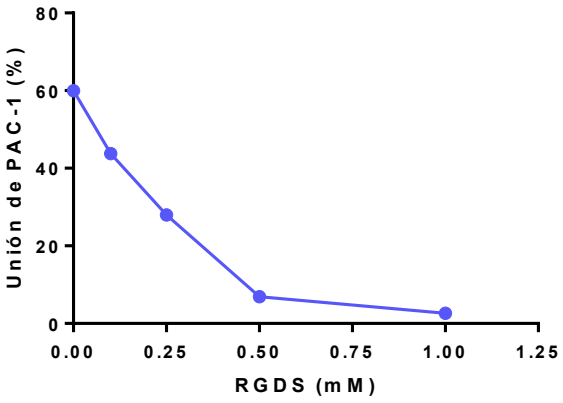


Figura 9. Curva de inhibición de la unión de PAC-1 en presencia del péptido RGDS. Se estimularon MKs normales con 20 µM de ADP y epinefrina en presencia de concentraciones crecientes del péptido sintético RGDS y se evaluó la unión de PAC-1-FITC por citometría de flujo.

3.2.11.3. Activación de las vías de señalización de las GPs

MKs maduros normales se incubaron durante 30 minutos con 10 % de plasmas recalcificados de PTI o de controles normales a una concentración de $1x10^6$ células/pocillo en una placa de 6 pocillos. A continuación, estas suspensiones se sembraron en pocillos, previamente recubiertos, durante 1 minuto. Dependiendo del tipo de autoanticuerpo a evaluar los MKs se cultivaron sobre fibrinógeno, colágeno de

tipo I o FvW, como se describe para los experimentos de adhesión y *spreading*, para evaluar la fosforilación de la integrina β3, de la cadena liviana de la miosina no muscular (MLC_2) o de las quinasas de la familia Src, respectivamente. Después de la incubación a 37º C en atmósfera húmeda con 5 % de CO_2, las células se cosecharon, se lavaron con PBS-EDTA 2mM a 4º C y se extrajeron las proteínas utilizando buffer de lisis. Los extractos proteicos se cuantificaron por el método de Bradford (1976), y las proteínas se desnaturalizaron y se resolvieron mediante electroforesis de una dimensión en gel de poliacrilamida al 12 % con SDS, para luego ser transferidas a membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) en condiciones semi-secas. Dependiendo del caso, las proteínas fueron reveladas con anti-fosfo-β3 (Tyr773) (policlonal) (abcam, Cambridge, MA, EEUU), anti-β3 (policlonal) (Santa Cruz, Dallas, Texas, EEUU), anti-fosfo-MLC_2 (Ser19) (policlonal) (Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU), anti-fosfo-Src family (Tyr418) (clon EP503Y) (abcam) o anti-β-actina (clon AC-15) (Sigma-Aldrich). Las bandas inmunorreactivas se detectaron usando los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Sigma-Aldrich y Cell Signaling) y con el reactivo quimioluminiscente LumiGLO (Cell Signaling). Luego del revelado de las bandas resueltas tras la técnica de western-blot, las placas radiográficas fueron escaneadas y la intensidad de las bandas se cuantificó empleando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU).

3.2.12. Estudios de interacción con células CD3+ y mononucleares de sangre periférica

Para abordar este objetivo, todas las células que interactúen deben tener un origen común, evitando de este modo reacciones de incompatibilidad celular entre ellos. Dado que los leucocitos de sangre de cordón umbilical son inmaduros en su capacidad de inmunocompetencia, se utilizó la sangre periférica de individuos sanos que recibieron factores de crecimiento para ser donantes en un trasplante alogénico. A partir de estas muestras es posible obtener un número suficiente de progenitores hematopoyéticos CD34+ susceptibles de ser diferenciados a MKs a la vez que se pueden separar las células mononucleares como fuente de células citotóxicas.

Se cultivaron MKs maduros conjuntamente con el doble de células CD3+, o mononucleares de sangre periférica, por 24 horas, en presencia de 10 % de plasmas recalcificados de PTI o controles normales. Luego de ello, se realizaron los estudios de apoptosis.

3.2.13. Detección de marcadores apoptóticos por citometría de flujo

3.2.13 .1. Detección de fosfatidilserina

Se determinó la externalización de la fosfatidilserina en MKs cultivados durante 24 horas en presencia de 10 % de los plasmas en estudio, ya sea con o sin el agregado de células accesorias (células CD3+ y mononucleares totales). Para ello, se utilizó un kit comercial (BD Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la anexina V unida al fluorocromo FITC provista por el kit, es capaz de unirse a la fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana celular en células apoptóticas. Las células fueron incubadas durante 15 minutos con el reactivo anexina V-FITC y además, con un anticuerpo anti-CD4a1-PE (clon HIP8), o anti-CD42b-PE (clon HIP1), (BD Biosciences), para seleccionar la población de MKs al momento del análisis. Como control positivo se midieron MKs estimulados con A23187 (Sigma-Aldrich) 24 µM durante 1 hora. Una vez finalizada la incubación, las muestras se adquirieron en citómetro de flujo dentro de la hora de marcadas.

3.2.13.2. Detección de caspasas 3 y 7 activadas

Se evaluó la activación de las caspasas 3 y 7 en MKs cultivados durante 24 horas en presencia de 10 % de los plasmas en estudio con el agregado de células mononucleares totales. Se utilizó el kit in situ CaspaTag FLICA (Fluorochome Inhibitors of Caspases) (Millipore, Chemicon International, Billerica, MA, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se utilizó un péptido inhibidor de caspasa-3 (FAM-DEVD-FMK) que produce fluorescencia verde al unirse covalentemente a la caspasas 3 y 7 activadas inhibiendo su actividad enzimática. Como control positivo se midieron MKs estimulados con A23187 (Sigma-Aldrich) 24 µM durante 1 hora. Las muestras se incubaron durante una hora con el péptido y con un anticuerpo anti-CD41-Pea (clon HIP8), o anti-CD42b-PE (clon HIP1), (BD Biosciences) y luego de un lavado se analizaron por citometría de flujo.

3.2.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± DE. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado según el caso. Dependiendo del diseño experimental y estadístico, los resultados obtenidos se analizaron utilizando diferentes pruebas paramétricas o no paramétricas. Para la comparación de los resultados entre dos grupos se utilizaron pruebas t de Student, o de Mann-Whitney; para comparar tres o más grupos se realizaron análisis con ANOVAs de un factor, o pruebas de Kruskal-Wallis, y las correspondientes comparaciones múltiples a posteriori de Tukey, de Dunnet, de Dunn, etc. A su vez, se efectuó un análisis con un ANOVA de 2 factores para comparar el recuento de PPs en suspensión y sobre fibrinógeno de los distintos grupos de plasmas. Por otro lado, se efectuaron correlaciones de Pearson para establecer la existencia de asociación entre dos variables estudiadas. En cada caso, previamente se corroboró el cumplimiento de todos los supuestos necesarios para la aplicación de cada una de las pruebas estadísticas utilizadas. La aplicación de las mismas se llevó a cabo empleando el programa Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EEUU). Valores de $p<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

4. Resultados

4.1. Plasmas recalcificados de pacientes con PTI

Se obtuvieron plasmas recalcificados de 31 pacientes con PTI cuyas características se detallan en la tabla 1. Utilizando el kit comercial como se indica en el punto 3.2.5, se detectó la presencia de autoanticuerpos plasmáticos en 8 de los 23 pacientes analizados. Todas las muestras de plasma correspondieron a recuentos de plaquetas en sangre periférica menores a $90x10^9$/L.

Tabla1. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con trombocitopenia inmune incluidos en este trabajo.

Paciente	Sexo	AutoAcs	Puntaje de sangrado	Edad[a]	Rto. PLQs ($x10^9$/L)[a]	Tratamiento[a]
1	F	ND	2	60	46	Espl.
2	F	ND	2	57	63	Corticoides
3	F	NM	2	61	32	Corticoides
4	M	NM	2	41	58	Corticoides
5	F	NM	0	51	10	Sin tratamiento
6	M	ND	2	34	8	Espl./Corticoides
7	F	NM	2	59	62	Corticoides
8	M	ND	0	80	85	Corticoides
9	F	ND	0	74	20	Sin tratamiento
10	F	ND	2	39	36	Sin tratamiento
11	M	IIbIIIa	2	44	30	Espl./Azatioprina
12	F	IIbIIIa	1	65	30	Sin tratamiento
13	F	IbIX	2	36	16	Espl./Corticoides
14	F	ND	1	54	16	Corticoides
15	F	ND	2	69	22	Corticoides
16	M	IIbIIIa	2	38	6	Sin tratamiento
17	M	ND	2	40	29	Espl./Corticoides
18	F	ND	2	48	48	Corticoides
19	F	NM	1	22	23	Sin tratamiento
20	F	ND	1	54	30	Corticoides
21	F	ND	2	40	10	Espl.
22	F	IaIIa	2	33	50	Espl./Corticoides
23	F	ND	0	42	65	Corticoides
24	F	ND	2	21	38	Sin tratamiento
25	F	ND	2	41	2	Corticoides
26	F	ND	1	75	30	Corticoides
27	M	IIbIIIa	1	43	50	Corticoides
28	F	IIbIIIa + IaIIa	1	80	40	Corticoides
29	F	IIbIIIa + IaIIa	2	23	48	Espl.
30	F	NM	1	18	50	Sin tratamiento
31	F	ND	1	59	16	Corticoides

AutoAcs: autoanticuerpos; Rto. PLQs: recuento de plaquetas; F: femenino; M: masculino; ND: no detectado; NM: no medido; Espl.: esplenectomía. [a] al momento de la toma de la muestra.

4.2. Efecto del plasma recalcificado de pacientes con PTI sobre la trombopoyesis

Para investigar si una alteración en la formación de PPs podría ser un mecanismo que contribuya a la trombocitopenia en PTI, MKs normales maduros (correspondientes al día 13 de cultivo) fueron incubados en presencia de 10 % de plasmas recalcificados de PTI o controles normales como se indica en el punto 3.2.8.

4.2.1. Los plasmas de PTI inducen inhibición de la formación de PPs

En primer lugar, se realizó un ensayo piloto para evaluar la cinética de formación de PPs. Para ello se incubaron MKs maduros (día 13 de cultivo) agregando al medio de cultivo 10 % de plasma control y se evaluó la formación de PPs a lo largo del tiempo. Se observó un aumento progresivo de MKs produciendo PPs en las primeras 24 hs, llegando al máximo a las 48 hs y manteniéndose constante hasta las 72 hs para luego comenzar a disminuir.

En función de la cinética observada, se llevó a cabo un segundo experimento incubando los MKs maduros en presencia de un plasma control y un plasma de un paciente con PTI. Se observó que el plasma de PTI indujo inhibición en la formación de PPs que comenzó a evidenciarse a las 24 horas (Figura 10). Sin embargo, fue a las 48 horas que se obtuvieron diferencias en el porcentaje de MKs produciendo PPs en presencia de las muestras del paciente y del control.

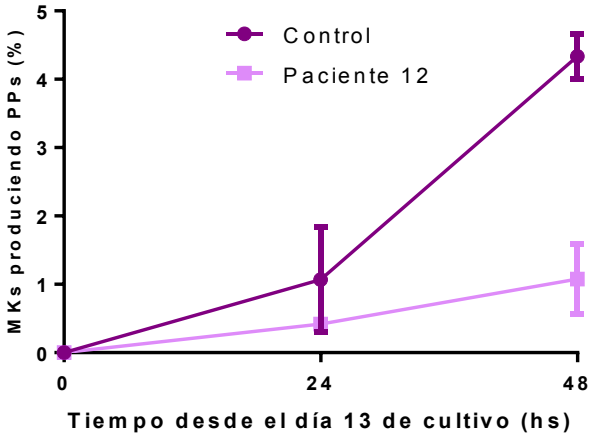


Figura 10. Cinética de la inhibición de la trombopoyesis inducida por el plasma de PTI. Células CD34+ de cordones umbilicales sanos fueron cultivadas por 13 días como se describió para obtener MKs maduros. A continuación se adicionó 10 % de un plasma de PTI o de un control normal (tiempo cero 0 de incubación). Las muestras fueron posteriormente incubadas en estufa a 37º C y atmósfera húmeda con 5 % de CO_2. Se realizó el recuento de PPs por observación en microscopio invertido Axiovert 25 (Carl Zeiss) luego de 24 y 48 hs. Cada muestra fue evaluada por duplicado en experimentos independientes utilizando MKs de cordones umbilicales distintos.

Considerando estos resultados preliminares, se estableció un período de 48 horas de incubación para evaluar el efecto de los 31 plasmas de PTI (Tabla 1) en comparación con muestras de controles. El porcentaje promedio de MKs produciendo

PPs en presencia de plasmas de PTI resultó ser significativamente menor que en presencia de plasmas controles, 3,11 ± 0,22 % (media ± DE) y 4,83 ± 0,24 %, respectivamente (Figura 11a). En particular, los recuentos de PPs en presencia de 14 de los 31 plasmas de PTI se encontraron por debajo del límite inferior establecido (media del grupo control – 2 DE) bajo el cual los valores se consideran disminuidos (similar a una significación estadística con $p<0,05$). Estos resultados demuestran que los plasmas de PTI inducen un defecto en el mecanismo de la trombopoyesis sin alterar, como se observa en la figura 11b, la viabilidad de los MKs. Imágenes de campos representativos observados al microscopio invertido correspondientes a cultivos con un plasma control y con uno de PTI pueden observarse en las figuras 11c y 11d, respectivamente.

Además, en las muestras incubadas con plasma de pacientes se observó con frecuencia PPs de morfología aberrante, más rudimentaria y poco complejas en comparación con las que se desarrollaron en presencia de plasmas de controles (flechas blancas y negras, respectivamente, en figuras 11c-d).

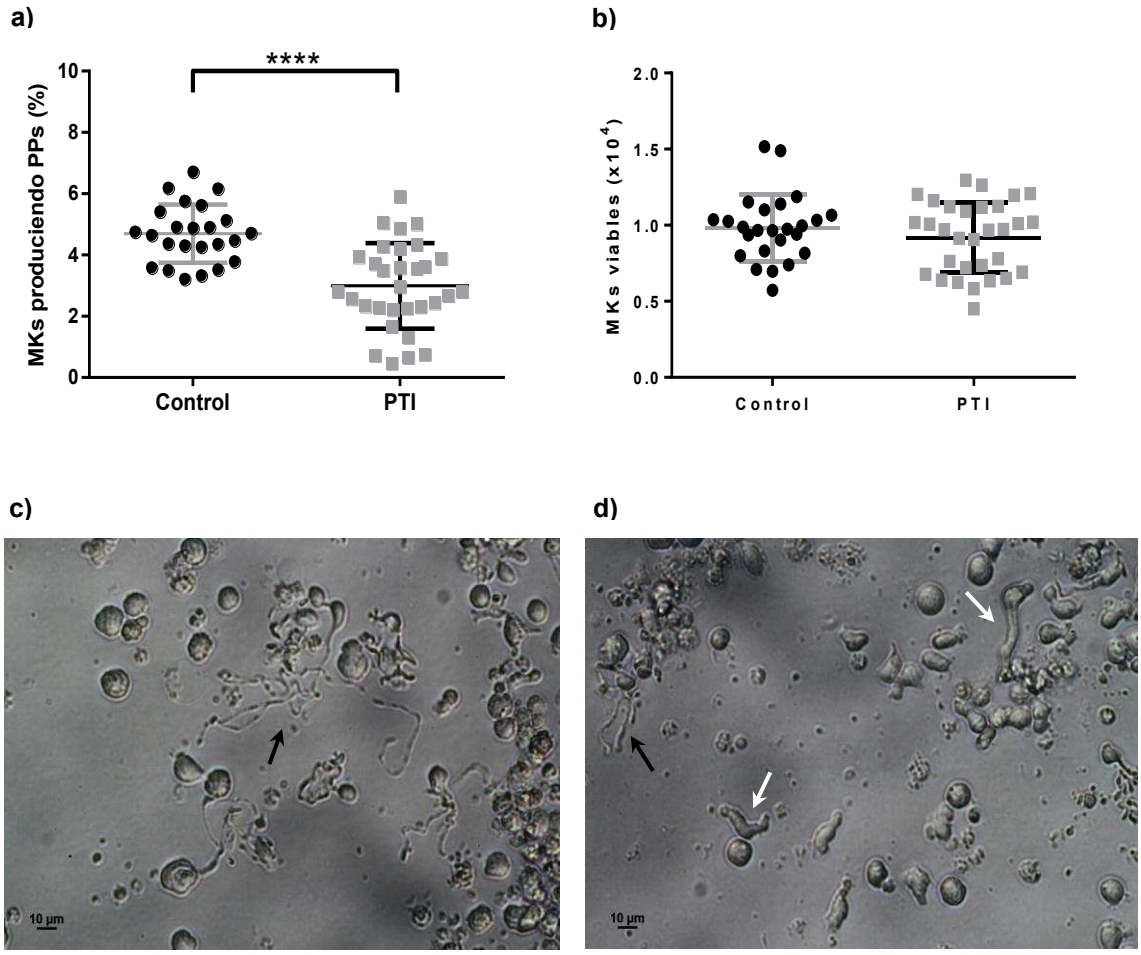


Figura 11. Recuento de PPs en presencia de plasmas de PTI. MKs maduros se incubaron en presencia de 10 % de plasma de PTI (n=31) o de controles normales (n=24) Luego de 48 hs se realizó el recuento de PPs. (a) El porcentaje de MKs produciendo PPs fue calculado considerando la cantidad de MKs viables. (b) Cantidad de MKs viables obtenido a partir del recuento de células vivas (excluyendo a aquellas positivas para la coloración con azul de tripán) y del porcentaje de las células CD61+. Cada valor corresponde al promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se grafica la media ± DE. Prueba t de Student no pareada. ****p<0,0001. Fotografías representativas de MKs produciendo PPs en presencia de un plasma control (c) y de un plasma de PTI (d) en las que se señalan PPs con morfología normal (flecha negra) y atípica (flechas blancas). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 32x, fotografiadas con una cámara Olympus DP70 CCD (Olympus) y adquiridas a través del software Lumina Vision (Mitani Corporation, Tokyo, Japón).

4.2.2. El nivel de inhibición de la trombopoyesis depende de la dosis de plasma de PTI agregado

Con el objeto de establecer si la inhibición en la formación de PPs resulta dependiente de la concentración del plasma, se evaluó la misma en presencia de diluciones seriadas de los plasmas de dos pacientes. Para este estudio se seleccionaron dos plasmas que habían producido una fuerte inhibición cuando fueron evaluados al 10 %: uno portador de anticuerpos anti-GPIIb-IIIa (paciente 12) y otro con anti-GPIb-IX-V (paciente 13). Esta inhibición fue atenuada de manera dosis-dependiente a medida que se diluyeron los plasmas de estos pacientes con un pool de plasmas normales, aunque el efecto inhibitorio se mantuvo incluso cuando la concentración de los plasmas de PTI fue de 2,5 % (Figura 12).

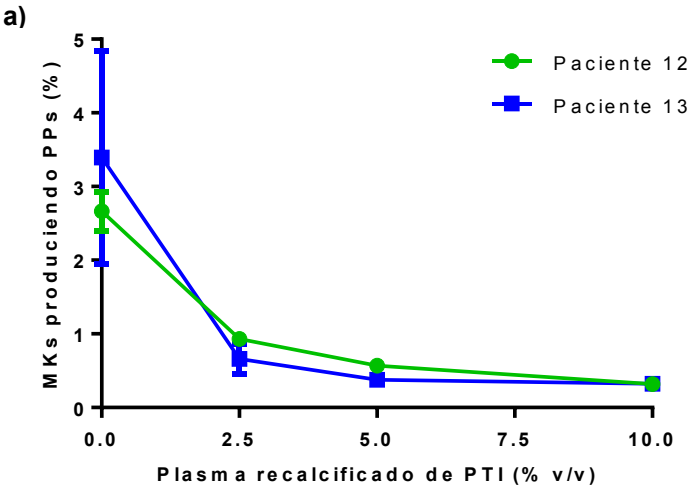


Figura 12. El efecto inhibitorio sobre la trombopoyesis en función de la concentración de los plasmas de PTI. Curva de concentración para dos plasmas de pacientes que habían mostrado un marcado efecto inhibitorio sobre la trombopoyesis al incubarse al 10 % del volumen total de cultivo. Partiendo desde una concentración de 10 %, cada uno de los plasmas se diluyó con un pool de plasmas recalcificados normales. El punto 0 (% v/v) corresponde a 10% de plasma control. Las muestras se evaluaron por duplicado en experimentos independientes.

4.2.3. Los plasmas de PTI no afectan la maduración de MKs normales en la etapa final de su desarrollo

Estudios publicados por otros investigadores (McMillan y col., 2004) describieron que los plasmas de PTI afectan la maduración megacariocítica cuando son adicionados desde el inicio del cultivo de los progenitores hematopoyéticos. Por ello, se decidió investigar si en nuestras condiciones experimentales (incubación con plasmas desde el día 13 y durante 48 horas) los plasmas de PTI podrían interferir con la maduración de los MKs en su etapa final. El análisis de la expresión de CD61 y CD42b por citometría de flujo (sección 3.2.4) no mostró diferencias entre los MKs incubados con plasmas de PTI y de controles normales (CD61: 89,4 ± 5,2 % PTI vs. 90,5 ± 2,4 % controles; CD42b: 72,9 ± 4,5 % PTI vs. 74,5 ± 9,0 % controles; prueba de Mann–Whitney). Esto fue confirmado por la evaluación de los estadíos madurativos de los MKs mediante inmunofluorescencia (no mostrado). Estos resultados indican que la inhibición en la trombopoyesis bajo estas condiciones experimentales no se debe a una reducción en la maduración de los MKs sino a un efecto directo de los plasmas de PTI sobre la formación de PPs.

4.2.4. Relación entre la inhibición de la formación de PPs y las características bioquímicas y clínicas de los pacientes con PTI

4.2.4.1. Recuento de plaquetas y datos poblacionales

Se analizó la relación entre el porcentaje de formación de PPs en presencia de los 31 plasmas de los pacientes con PTI y el recuento de plaquetas en sangre periférica, no encontrándose correlación entre ambos parámetros (correlación de Pearson, r = -0,1111). Cabe destacar que todas las muestras utilizadas correspondían a pacientes con trombocitopenia franca, ya que el criterio de inclusión fue un recuento plaquetario menor a $90x10^9$/L.

Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en cuanto al sexo o la edad de los pacientes respecto a su efecto sobre la trombopoyesis (prueba t de Student y de Kruskal-Wallis, respectivamente).

4.2.4.2. Manifestaciones hemorrágicas

Considerando que dentro del grupo estudiado los pacientes presentaron distinto grado de sangrado, se evaluó el efecto de los plasmas de PTI sobre la trombopoyesis en función del puntaje de sangrado que se asignó en base al historial de manifestaciones hemorrágicas. Este puntaje se basa en valores discretos entre 0 y 2 dependiendo de los síntomas de sangrado y calculada utilizando los criterios de Page y colaboradores (2007) que arroja valores más altos a mayores manifestaciones hemorrágicas.

Se observó una tendencia que relaciona un mayor puntaje de sangrado con un mayor efecto inhibitorio sobre la trombopoyesis, encontrándose diferencias estadísticas entre la producción de PPs en presencia de plasmas de pacientes con puntaje de sangrado de 1 y 2 respecto al grupo control (Figura 13). Es interesante mencionar que en el grupo con puntaje de sangrado 0 todos los pacientes fueron negativos para la detección de autoanticuerpos. Por otro lado, no se observaron diferencias en los recuentos de plaquetas entre los distintos grupos, ya sea analizando al grupo completo de pacientes o solo a aquellos que no se encontraban en tratamiento (Prueba de Kruskal-Wallis).

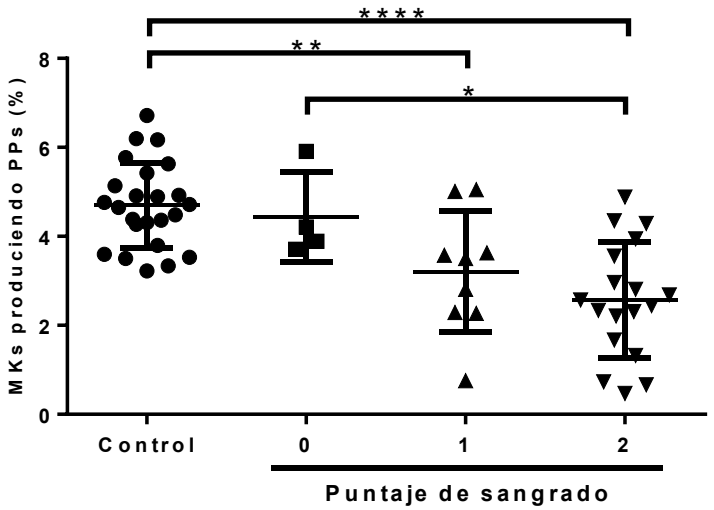


Figura 13. Recuento de PPs en función del puntaje de sangrado asignado al momento de la consulta médica. Desglose de los resultados graficados en la figura 2a. Las barras indican la media ± DE. Análisis estadístico por ANOVA de un factor con comparaciones múltiples de Dunnett y Tukey, para comparar contra el grupo control y entre los plasmas de PTI, respectivamente. *p<0,01; **p<0,001; ****p<0,0001.

4.2.4.3. Tratamiento

La presencia o ausencia de tratamiento, así como los diferentes tipos de tratamiento dirigidos ya sea a la modulación del sistema inmune como a la remoción

del bazo, principal sitio de eliminación de plaquetas, no influyó sobre la trombopoyesis (Figura 14).

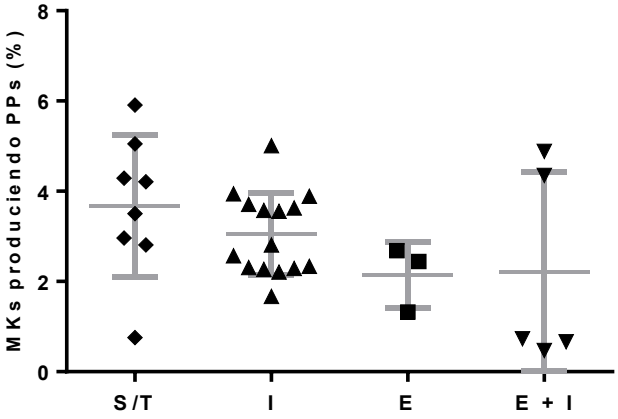


Figura 14. Recuento de PPs en función del tratamiento recibido por los pacientes al momento de la toma de la muestra de plasma. Desglose de los resultados graficados en la figura 2a. Cada valor corresponde al promedio de al menos 3 experimentos independientes. S/T: sin tratamiento; I: inmunomoduladores; E; esplenectomía sin medicación; E+I: esplenectomía e inmunomoduladores; ANOVA de un factor sin significación estadística.

El recuento de plaquetas del grupo en tratamiento con inmunomoduladores (41,27 ± 22,85) no difirió del grupo sin tratamiento (26,63 ± 14,80) (prueba t de Student no pareada). Cabe destacar que el tratamiento con inmunomoduladores, que consistió en la administración de corticoides en la mayoría de los casos y azatioprina en un paciente, se implementó para mantener el recuento de plaquetas dentro de un rango seguro desde el punto de vista hemostático (mayor a 20-30 $x10^9$/L) y no para llegar a cifras normales.

A 11 pacientes se les realizó un seguimiento obteniendo muestras de plasma recalcificado en distintos momentos de su evolución. De este grupo, 7 pacientes se encontraron siempre bajo tratamiento con inmunomoduladores. En uno de ellos, se observaron variaciones en la producción de PPs, mientras que los plasmas de los 6 pacientes restantes mantuvieron un efecto similar sobre la capacidad trombopoyética de los MKs, sin mostrar mayores cambios en los recuentos de PPs. Por otro lado, 2 de los 11 pacientes no estaban recibiendo tratamiento durante las tomas de las muestras. En estos casos tampoco se observaron variaciones en su efecto sobre la formación de PPs. En particular, se destacan otros dos casos. Por un lado, el paciente 11, que en todo momento tuvo recuentos plaquetarios bajos aún con diferentes tratamientos, mostró un aumento en la formación de PPs alcanzando valores cercanos al límite inferior normal en presencia de la muestra obtenida bajo tratamiento con eltrombopag, un mimético de la trombopoyetina (Figura 15a). Por otra parte, en el único paciente que recibió inmunoglobulina G intravenosa (paciente 1), el recuento de PPs se

normalizó en presencia de la muestra obtenida luego de la infusión, en concordancia con el aumento de recuento plaquetario hasta valores normales (Figura 15b).

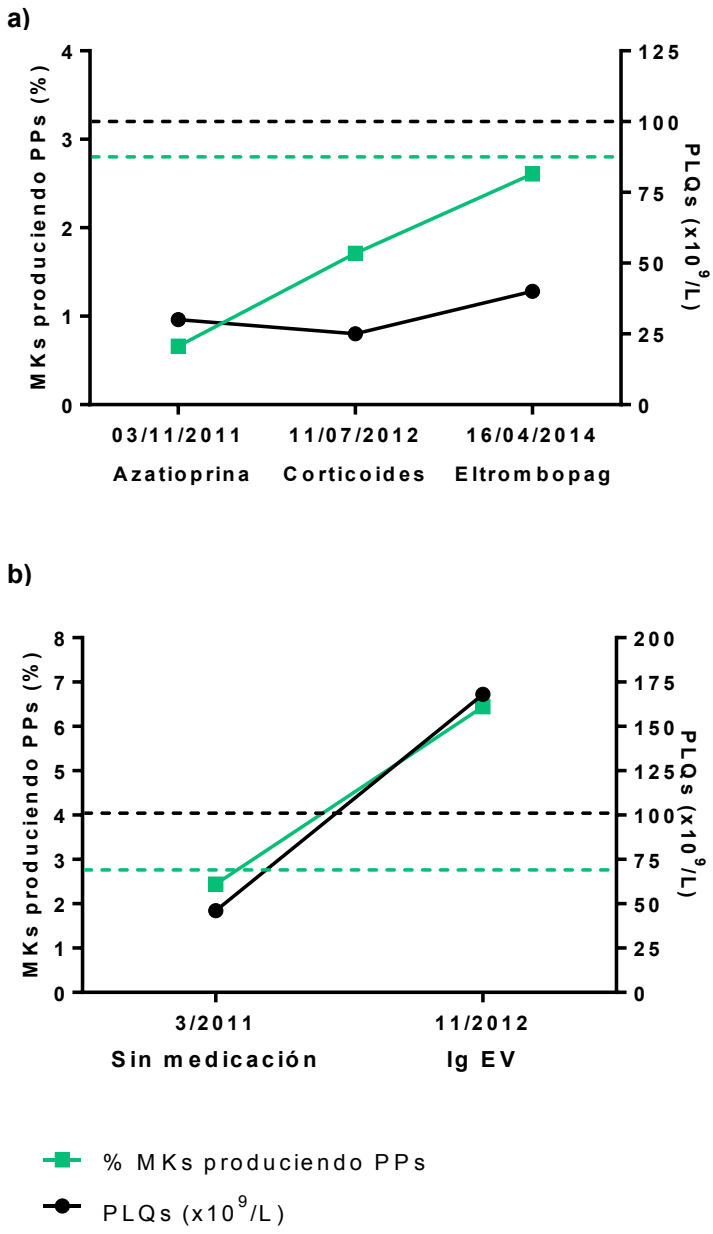


Figura 15. Efecto del plasma recalcificado de PTI sobre la formación de PPs en diferentes momentos del tratamiento. En el eje de abscisas se indica la fecha de toma de la muestra y el tratamiento bajo el cual se encontraba el paciente en ese momento. Eje de la izquierda, porcentaje de PPs simbolizado con cuadrados verdes. La línea punteada verde marca el límite (media control – 2 DE) bajo el cual se consideró que una muestra inhibe la formación de PPs. Eje de la derecha, recuento de plaquetas en sangre periférica, simbolizado por círculos negros. La línea punteada negra establece el número de plaquetas circulantes bajo el cual se considera que una persona padece trombocitopenia ($100x10^9$/L). (a) Seguimiento del paciente 11. Se evaluaron muestras de plasma extraídas en 3 momentos diferentes. (b) Seguimiento del Paciente 1. Se pudieron analizar 2 muestras a lo largo del tiempo. Ambos pacientes habían sido esplenectomizados antes de la obtención de la primera muestra. IgEV, inmunoglobulina endovenosa.

4.2.5. Anticuerpos anti-plaquetarios

Al desglosar los resultados obtenidos de acuerdo a la presencia o ausencia de autoanticuerpos en los plasmas de PTI, observamos que 3 de los 4 plasmas con anti-GPIIb-IIIa, los 2 plasmas con anti-GPIIb-IIIa y anti-GPIa-IIa, y el único plasma con anti-GPIb-IX-V inhibieron la formación de PPs. En cambio, el recuento de PPs fue normal

en presencia del plasma con anticuerpos dirigidos contra la GPIa-IIa (Figura 16). Por otro lado, las muestras a las que no se les detectaron autoanticuerpos tuvieron un comportamiento heterogéneo, aunque se observaron diferencias estadísticas respecto al grupo control.

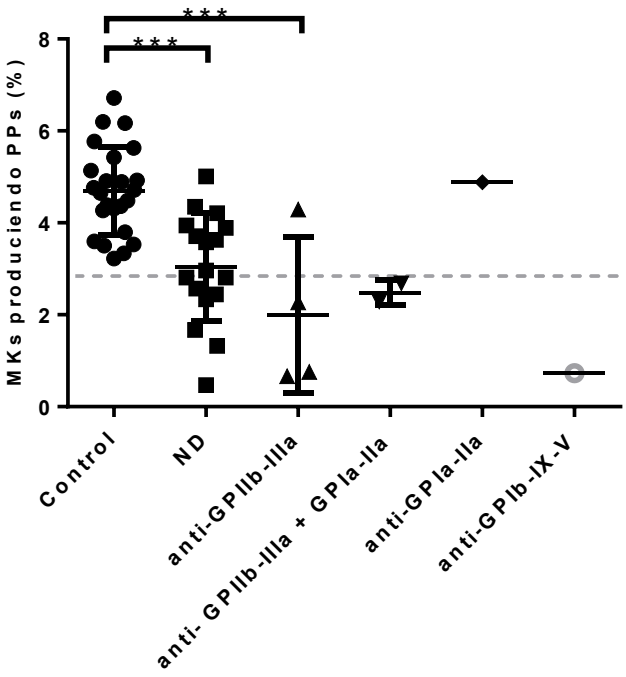


Figura 16. Recuento de PPs en presencia de muestras de PTI divididas de acuerdo a la presencia o ausencia de autoanticuerpos plasmáticos. Desglose de los resultados graficados en la figura 2a. Cada valor corresponde al promedio de al menos 3 experimentos independientes. ND: autoanticuerpos no detectados. Las barras indican la media ± DE. La línea punteada representa la media del grupo control – 2 DE, un límite de corte bajo el cual los valores se encuentran dentro del 2,1 % inferior, similar a una significación estadística con $p<0,05$. ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples de Dunnett y Tukey, para comparar contra el grupo control y entre los distintos grupos de plasmas de PTI, respectivamente. ***$p<0,001$.

4.2.6. Los plasmas de PTI reducen la complejidad de las PPs

Habiendo detectado la presencia de PPs con morfología aberrante en MKs incubados en presencia de plasmas de PTI al realizar los recuentos en los cultivos en fresco (Figura 11c, flechas blancas), se decidió profundizar en el estudio de las alteraciones en la trombopoyesis producidas por el plasma de PTI. Para ello, MKs maduros fueron cultivados desde el día 13 al día 15 sobre cubreobjetos circulares de vidrio previamente recubiertos con fibrinógeno y en presencia de 10 % de plasmas de PTI (n=12) o de controles normales (n=12). Cabe destacar que, como se mostrará más adelante, la trombopoyesis sobre fibrinógeno reproduce lo que se observa en suspensión.

Las muestras se procesaron como se indica en la sección 3.2.10 y se analizó la arquitectura de los MKs formando PPs en las fotografías tomadas, utilizando un software de análisis celular. A fin de evitar variaciones morfológicas debidas a

características intrínsecas de MKs derivados de diferentes cordones umbilicales, todas las muestras fueron evaluadas utilizando MKs originados de los mismos cordones. Se midieron 6 parámetros morfológicos como se detalla en la figura 17a. Los MKs que habían sido cultivados con los plasmas de PTI (n=12) presentaron una estructura atípica en sus proplaquetas respecto a aquellas observadas en presencia de plasmas controles. Esa arquitectura aberrante de las proplaquetas se caracterizó por una disminución en su longitud, un incremento en su ancho máximo (Figura 17b) así como un menor número de *swellings* (engrosamientos), de ramificaciones, de tips (extremos) definidos y una reducida cantidad general de proplaquetas por cada MK analizado (Figura 17c). Todos los parámetros morfológicos medidos resultaron estadísticamente afectados en aquellos MKs cultivados con plasmas de PTI, lo que habla de una menor complejidad de los procesos proplaquetarios inducida por los plasmas de los pacientes (Figuras 17d y 17e).

Estos resultados sugieren que la anormal trombopoyesis no sólo comprende una disminución en el número de MKs capaces de producir proplaquetas sino, además, una alteración en la estructura de las mismas.

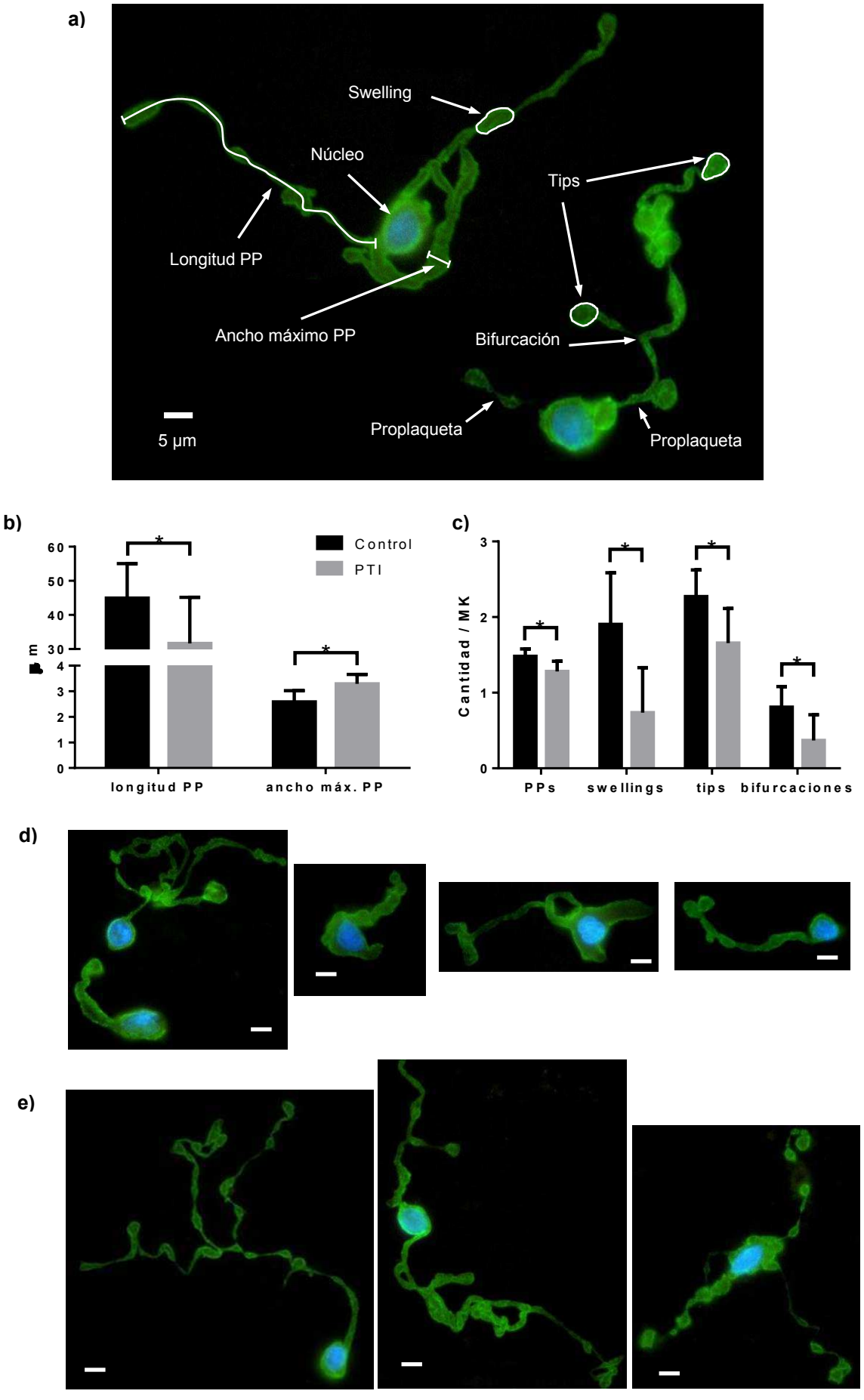

a)
Swelling
Núcleo
Tips
Longitud PP
Ancho máximo PP
Bifurcación
5 µm
Proplaqueta
Proplaqueta
b)
Control
PTI
µm
longitud PP
ancho máx. PP
c)
Cantidad / MK
PPs
swellings
tips
bifurcaciones
d)
e)

Figura 17. Análisis de la morfología proplaquetaria de MKs normales en presencia de plasma de PTI. MKs maduros fueron sembrados sobre fibrinógeno junto con 10 % de plasma de PTI o de controles normales. Luego de 48 horas, se realizó una inmunofluorescencia con anti-CD61-FITC y Hoesch 33258. Las fotografías para el análisis fueron tomadas utilizando un microscopio de epiiluminación con un objetivo de inmersión 1000X (Carl Zeiss GmbH). (a) Fotografías de 2 MKs produciendo proplaquetas de morfología normal en la que se muestran los parámetros morfológicos considerados para el análisis. (b) Evaluación del número de PPs, *swellings*, tips y bifurcaciones por MK en presencia de plasmas de PTI (n=12) o controles normales (n=12). (c) Longitud de las PPs y ancho máximo de las mismas medidos en μm utilizando el software Master Morphology (VideoTesT). Los resultados representan las medias ± DE de al menos 40 MKs produciendo PPs para cada muestra. (d) Fotografías representativas de MKs produciendo PPs en presencia de plasmas de PTI y, (e), de controles normales. Barra: 5 μm. Prueba t de Student no pareada. *p<0,01.

Por otro lado, para la evaluación de las alteraciones morfológicas de las PPs se estableció un puntaje para cada uno de los plasmas de pacientes con PTI que asigna 1 punto por cada una de las 6 variables analizadas que se encontrara fuera del rango normal (Figura 18). No se evidenció una clara asociación entre la presencia de un determinado autoanticuerpo y las alteraciones morfológicas observadas. Sin embargo, es interesante destacar que dentro del grupo con anticuerpos anti-GPIIb-IIIa, los plasmas de pacientes que produjeron inhibición del porcentaje de PPs también indujeron alteraciones morfológicas (barras negras con puntaje alto), mientras que en presencia del único plasma que no produjo inhibición de la trombopoyesis, las PPs tuvieron morfología normal (primera barra de la izquierda). Esto último se observó también en el caso del único plasma con autoanticuerpos dirigidos contra la GPIa-IIa (trombopoyesis y morfología normal). En cambio, si bien los MKs cultivados en presencia del plasma del paciente con autoanticuerpos anti-GPIb-IX-V sufrieron un profundo efecto inhibitorio en el porcentaje de PPs, la morfología de las mismas no estuvo notoriamente alterada (puntaje=1).

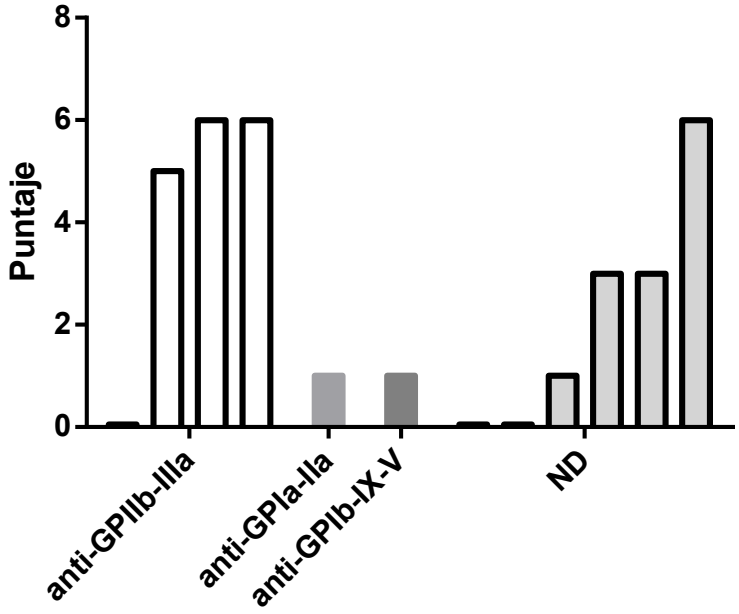


Figura 18. Puntaje de alteraciones morfológicas para cada uno de los pacientes (n=12) en función de la presencia o no de auto-anticuerpos detectados en el plasma. Para cada una de las 6 variables estudiadas, si el paciente presenta un valor fuera del rango normal adquiere 1 punto o de lo contrario, 0 puntos. Máximo=6; mínimo=0. ND: autoanticuerpos no detectados.

4.3. Efecto de las inmunoglobulinas G de PTI sobre la trombopoyesis

Para poner a prueba la hipótesis de que los autoanticuerpos de PTI son los responsables de las alteraciones sobre la trombopoyesis, se llevaron a cabo dos estrategias complementarias. En estos experimentos se utilizaron muestras de 2 pacientes que produjeron un marcado efecto inhibitorio en la formación de PPs: el paciente 12, portador de autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa, y el paciente 13, cuyo plasma contenía anti-GPIb-IX-V.

Por un lado, los plasmas de ambos pacientes fueron inmunodepletados tras ser incubados con plaquetas de donantes sanos siguiendo la metodología descripta en el punto 3.2.7, resultando en la remoción de los autoanticuerpos que fue confirmada mediante el kit de ELISA correspondiente. MKs maduros normales fueron incubados con 10 % de estos plasmas inmunodepletados, así como con su contraparte sin inmunodepletar, y luego de 48 horas se procedió a realizar el recuento de PPs. Como controles se utilizaron plasmas recalcificados de individuos sanos que fueron sometidos al mismo proceso de inmunodepleción. En presencia de los plasmas inmunodepletados de PTI, se observó la reversión del efecto inhibitorio provocado por los correspondientes plasmas recalcificados (Figura 19a).

Por otro lado, se evaluó el efecto de las fracciones de IgGs purificadas de los plasmas de estos dos pacientes en una concentración final de 2,5 % sobre los cultivos de MKs maduros normales. Ambas muestras de IgGs indujeron una inhibición similar a la producida por los plasmas recalcificados correspondientes (Figura 19b). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los autoanticuerpos contra la GPIIbIIIa y la GPIbIX presentes en las fracciones de IgGs de los pacientes 12 y 13, respectivamente, serían al menos en parte responsables del efecto inhibitorio sobre la trombopoyesis.

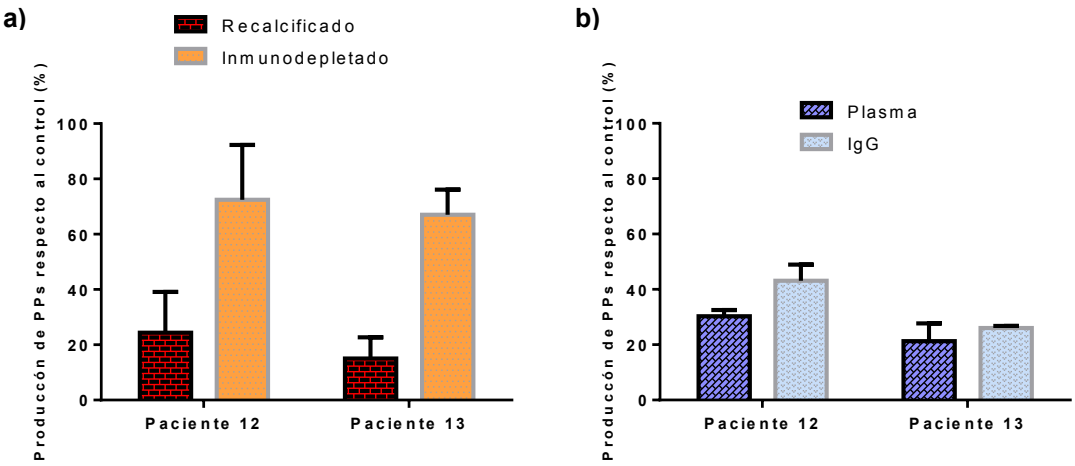


Figura 19. Efecto de los autoanticuerpos sobre la formación de PPs. (a) Formación de PPs en presencia de plasmas inmunodepletados. Se evaluó el efecto sobre la trombopoyesis en presencia de 10 % de plasma inmunodepletado y su correspondiente recalcificado completo. (b) Formación de PPs en presencia de las fracciones de IgGs purificadas. Se evaluó el efecto sobre la trombopoyesis en presencia de 2,5 % de las fracciones de IgGs y su correspondiente plasma recalcificado. En ambas estrategias las muestras se evaluaron por duplicado en experimentos independientes. Paciente 12, portador de anti-GPIIbIIIa; paciente 13, portador de anti-GPIb-IX-V. Se grafica la media ± DE respecto a los recuentos de PPs correspondientes obtenidos en presencia de muestras de controles sanos.

Habiendo observado que las IgGs purificadas de estos dos pacientes con PTI inducen alteraciones en la formación de PPs, se extendió el estudio para evaluar las IgGs purificadas de muestras de 5 pacientes más. Los MKs incubados con las IgGs de los pacientes (n=7) redujeron la producción de proplaquetas en un 45,59% respecto a las IgGs de los controles (n=3), similar a la disminución del 36,23% observada en presencia de los correspondientes plasmas recalcificados. La producción de PPs en presencia de las IgGs purificadas se correlacionó con la observada en presencia de los correspondientes plasmas recalcificados (correlación de Pearson, r=0,7220, p<0,05).

4.4. Alteración de la funcionalidad de los receptores megacariocíticos blanco de los autoanticuerpos

Una vez establecido que los plasmas de los pacientes con PTI inhiben la trombopoyesis, y que este efecto es mediado, al menos en parte, por los autoanticuerpos plasmáticos, se decidió profundizar el estudio explorando cómo podrían afectar estos autoanticuerpos el normal funcionamiento de los receptores contra los cuales están dirigidos.

4.4.1. Formación de PPs sobre fibrinógeno y colágeno de tipo I

En primera instancia, se cambió el sistema de evaluación de formación de PPs en cultivos en suspensión, por un sistema de MKs sembrados sobre superficies recubiertas con las distintas proteínas que funcionan como ligandos de los receptores megacariocíticos contra los que están dirigidos los autoanticuerpos.

Para evaluar el efecto de los plasmas conteniendo autoanticuerpos dirigidos contra la GPIIb-IIIa, se realizó el análisis cuantitativo en presencia de 10 % de los plasmas recalcificados, como fue explicado anteriormente, pero sembrando las células sobre pocillos previamente recubiertos con fibrinógeno (100 µg/mL). Se testearon 4 de los 6 plasmas de PTI con anti-GPIIb-IIIa, el plasma del paciente con anti-GPIa-IIa y 6 plasmas en los cuales no se detectaron autoanticuerpos.

Se sabe que el fibrinógeno estimula la trombopoyesis (Larson y Watson, 2006). En concordancia con esto, los MKs incubados sobre esta proteína en presencia de los plasmas controles, así como los cultivados con el plasma de PTI conteniendo anti-GPIa-IIa y con aquellos sin autoanticuerpos detectados, mostraron un aumento significativo en la formación de PPs respecto a lo observado en suspensión (Figura 20). Aunque el porcentaje de PPs en presencia de los plasmas conteniendo autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa también fue mayor en MKs sembrados sobre fibrinógeno, estos valores se mantuvieron por debajo del nivel normal, afectándose la trombopoyesis del mismo modo que lo observado en los cultivos en suspensión.

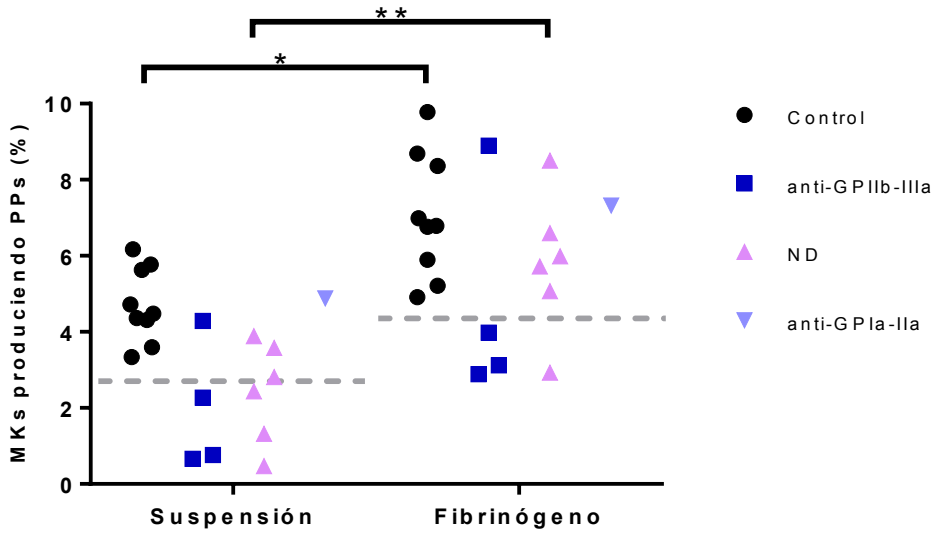


Figura 20. Producción de PPs en suspensión y sobre fibrinógeno. En el panel de la izquierda se grafica el porcentaje de PPs de Mks en suspensión mientras que en el de la derecha, los correspondientes a las células sembradas sobre 100 µg/mLde fibrinógeno. Las líneas punteadas representan la media del grupo control – 2 DE en cada caso, un límite de corte bajo el cual los valores se encuentran dentro del 2,1 % inferior, similar a una significación estadística con

p<0,05. ND: autoanticuerpos no detectados. ANOVA de 2 factores seguido de comparaciones simples. *p<0,05; **p<0,01.

Para evaluar la relevancia de la presencia de anticuerpos anti-GPIa-IIa, se realizó el análisis cuantitativo en presencia de 10 % de los plasmas recalcificados pero sembrando las células sobre pocillos previamente recubiertos con colágeno de tipo I (25 µg/ml), ligando de esta glicoproteína. Se evaluaron los 3 plasmas de PTI con anti-GPIa-IIa (2 de ellos conteniendo además anti-GPIIb-IIIa), 1 plasma con anti-GPIIb-IIIa y 5 plasmas controles. En paralelo, se realizaron los recuentos correspondientes de los MKs produciendo PPs en suspensión (sin agregado de matriz).

De acuerdo a los esperado en condiciones fisiológicas, tanto en presencia de los plasmas controles como del plasma de PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIIb-IIIa, el colágeno tipo I produjo una inhibición de la formación de PPs en comparación con el recuento obtenido en presencia de la misma muestra ensayada en suspensión. Sin embargo, en presencia de las tres muestras de PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIa-IIa, este efecto inhibitorio del colágeno tipo I estuvo ausente, observándose que el porcentaje de PPs fue igual o incluso mayor que el producido en suspensión (Figura 21a). Este resultado se reprodujo en presencia de la IgG purificada del paciente 22, que portaba únicamente anticuerpos anti-GPIa-IIa (no mostrado).

Los resultados también pueden ser expresados como la tasa de cambio en el porcentaje de formación de PPs obtenida sobre pocillos recubiertos con colágeno respecto a la producida sobre pocillos sin sustrato, para MKs incubados con una muestra dada (Figura 21b). Esta relación resultó significativamente diferente entre los pacientes con anti-GPIa-IIa y los controles normales.

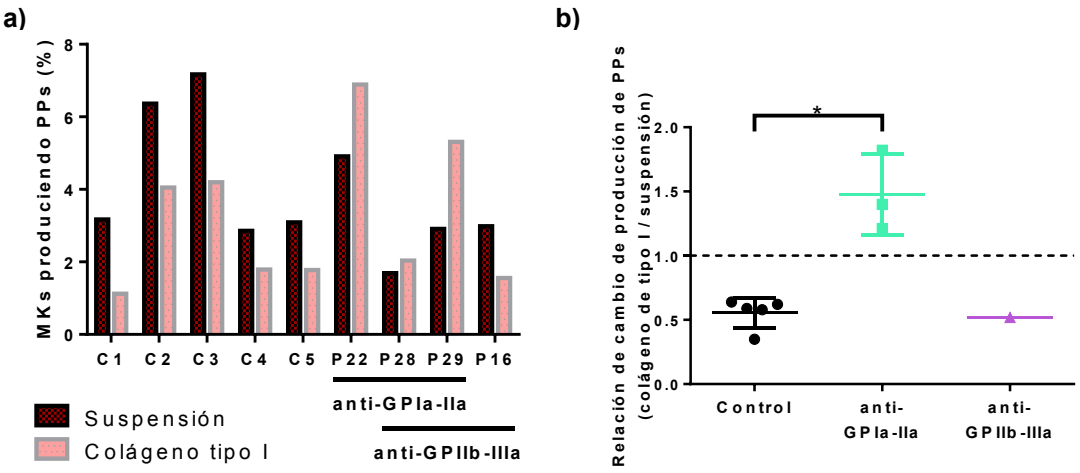


Figura 21. Ausencia del efecto inhibitorio producido por el colágeno de tipo I sobre la trombopoyesis en presencia de anticuerpos anti-GPIa-IIa de PTI. MKs maduros fueron sembrados sobre colágeno de tipo I en presencia de 10 % de plasma recalcificado de tres pacientes con PTI portando anti-GPIa-IIa (P22, P28 y P29), un paciente con anti-GPIIb-IIIa

(P16) y cinco controles normales (C1-5); el recuento de PPs se realizó como se describió previamente. (b) La relación de cambio en el recuento de PPs se calculó como el recuento obtenido sobre colágeno dividido por el obtenido en su correspondiente pocillo sin tapizar (suspensión). Las barras indican la media ± DE. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. Prueba de Mann-Whitney. *p<0.05.

4.4.2. Unión del PAC-1 al sitio activo de la glicoproteína IIb-IIIa de MKs normales en presencia de autoanticuerpos anti-GPIIb-IIIa de PTI

A fin de estudiar el efecto de los autoanticuerpos anti-GPIIb-IIIa sobre la funcionalidad de esta glicoproteína en MKs normales, se llevó a cabo el estudio de la unión del PAC-1, un anticuerpo que reconoce y se une al sitio activo de la GPIIb-IIIa, siguiendo la metodología explicada en el punto 3.2.11.1. Se evaluaron las muestras de los 6 pacientes con autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa y de 6 controles normales. Para el análisis, se agruparon las muestras de los 5 pacientes que mostraron disminución en la formación de PPs (FPPs baja). En este grupo, el promedio de unión de PAC-1 fue de 39,74 ± 12,44 %, mientras que en los controles fue de 51,76 ± 4,50 % (prueba de Mann-Whitney, p=0,0823). De estas muestras de PTI, 3 tuvieron valores por debajo del límite de corte normal demostrando que estos plasmas interfieren con la funcionalidad de la glicoproteína. Por otro lado, la unión de PAC-1 a MKs incubados con el plasma de PTI que no afectó la trombopoyesis (FPPs normal) estuvo conservada (Figura 22). Estos resultados, sumados al hecho de que los plasmas con anti-GPIIb-IIIa no muestren un único fenotipo respecto de la trombopoyesis, sugieren la existencia de diferencias en las características intrínsecas de los autoanticuerpos de esos pacientes (i.e. especificidad, grado de afinidad) que podría determinar su capacidad de interferir con la producción de PPs.

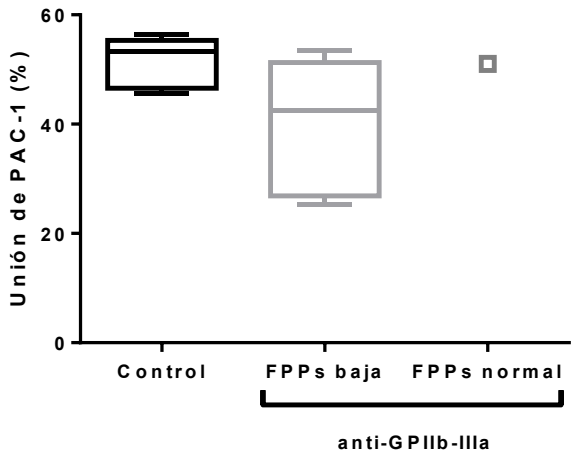


Figura 22. Unión de PAC-1 a los MKs en presencia de los plasmas de PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIIb-IIIa. Se incubaron Mks maduros con muestras de PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIIb-IIIa durante 24 hs. A continuación los MKs se estimularon con ADP/epinefrina y se evaluó la unión a PAC-1 por citometría de flujo. Gráfico de cajas indicando la media ± DE. FPPs baja: plasmas de los pacientes que inhibieron la formación de PPs; FPPs normal: plasma del paciente en presencia del que se observó una normal trombopoyesis. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Prueba de Mann-Whitney.

Se observó una correlación entre el nivel de unión de PAC-1 y la formación de PPs (correlación de Pearson r=0,6031, p=0,0379), lo que sugiere que la correcta funcionalidad de la GPIIb-IIIa es necesaria para el desarrollo normal de la trombopoyesis.

4.4.3. Adhesión y spreading de MKs sobre ligandos de los receptores blanco de los autoanticuerpos

Para evaluar si los autoanticuerpos de PTI dirigidos contra diferentes glicoproteínas del linaje megacariocítico interfieren con la unión fisiológica de estos receptores a sus respectivos ligandos, MKs normales maduros se incubaron durante 16 horas en presencia de 10 % de plasma de PTI, o de controles normales, sobre superficies recubiertas con las proteínas ligando dependiendo del tipo de auto-anticuerpo a analizar:

- Para evaluar los autoanticuerpos anti-GPIIb-IIIa se recubrieron cubreobjetos con 100 µg/mL de fibrinógeno.
- En el caso de los autoanticuerpos anti-GPIa-IIa se recubrió con 25 µg/mL de colágeno de tipo I.
- Para estudiar el efecto de los autoanticuerpos contra la GPIb-IX-V se recubrieron los cubreobjetos con 10 µg/mL de FvW y se agregó al medio de cultivo 500 uM del péptido de RGDS para evitar la unión del FvW a la GPIIb-IIIa.

Se analizaron 6 muestras de plasmas de pacientes con PTI portando anti-GPIIb-IIIa, 2 de ellas con anti-GPIa-IIa y 1 muestra de plasma con anti-GPIb-IX-V. Además, se evaluaron 4 plasmas de PTI sin autoanticuerpos detectados.

El porcentaje de MKs adheridos a fibrinógeno y colágeno de tipo I se redujo en presencia de las muestras de PTI con autoanticuerpos dirigidos contra sus correspondientes receptores (Figuras 23a y 23b). Estos resultados sugieren que dichos autoanticuerpos bloquearían las GPs IIb-IIIa y Ia-IIa afectando la adhesión normal y fisiológica de los MKs al fibrinógeno y al colágeno de tipo I, respectivamente. En los experimentos sobre FvW no se observó un comportamiento anormal en presencia del plasma con autoanticuerpos contra la GPIb-IX-V aunque el porcentaje de adhesión de los MKs en este caso resultó similar a los valores más bajos del grupo control (Figura 23c).

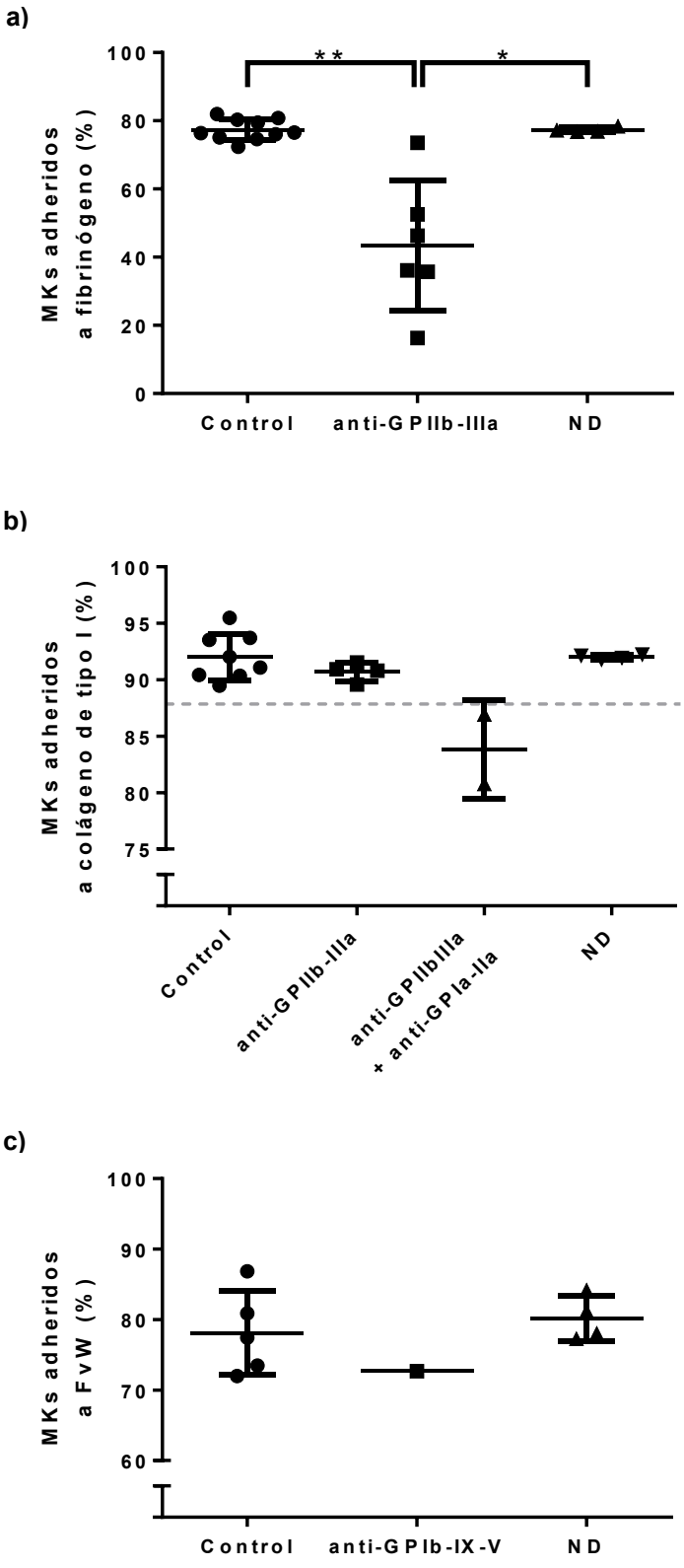


Figura 23. Efecto de los plasmas de PTI en la adhesión de MKs a proteínas de la matriz de la médula ósea (a) Adhesión de MKs al fibrinógeno: Luego de 16 horas de incubación en presencia de plasmas de PTI con autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa (n=6), sin autoanticuerpos detectados (ND; n=4) o de controles (n=10), se contó el número de MKs en los sobrenadantes de cultivo para calcular el porcentaje de células adheridas. Las barras indican la media ± DE. (b) Adhesión de MKs al colágeno de tipo I. La metodología utilizada fue la misma que para el experimento sobre fibrinógeno, incluyendo el número de muestras de plasmas de PTI. Para el análisis, de los 6 plasmas con anti-GPIIb-IIIa, se identificaron en una columna aparte las 2 muestras que además portaban anticuerpos contra la GPIa-IIa. Línea punteada: media ± 2 DE del grupo control (n=8) (límite de corte bajo el cual los valores se encuentran dentro del 2,1 % inferior, similar a una significación estadística con $p<0,05$). (c) Adhesión de MKs al FvW. Se realizó siguiendo la misma metodología anterior. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado en experimentos independientes. Prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples de Dunn. *$p<0,05$; **$p<0,01$.

Con el objeto de verificar que los autoanticuerpos sean los responsables de los resultados obtenidos sobre la adhesión de los MKs, se procedió a realizar el mismo

análisis que con los plasmas de PTI pero utilizando 2,5 % IgGs purificadas de 3 pacientes con anti-GPIIb-IIIa, de 2 con anti-GPIIb-IIIa y anti-GPIa-IIa, de 4 pacientes sin autoanticuerpos detectados y de 5 controles sanos. Las muestras de IgGs reprodujeron los resultados obtenidos en presencia de sus respectivos plasmas recalcificados (Figura 24), lo que demuestra que los autoanticuerpos son efectivamente responsables de los efectos observados, tal y como se ha demostrado anteriormente para la producción de PPs.

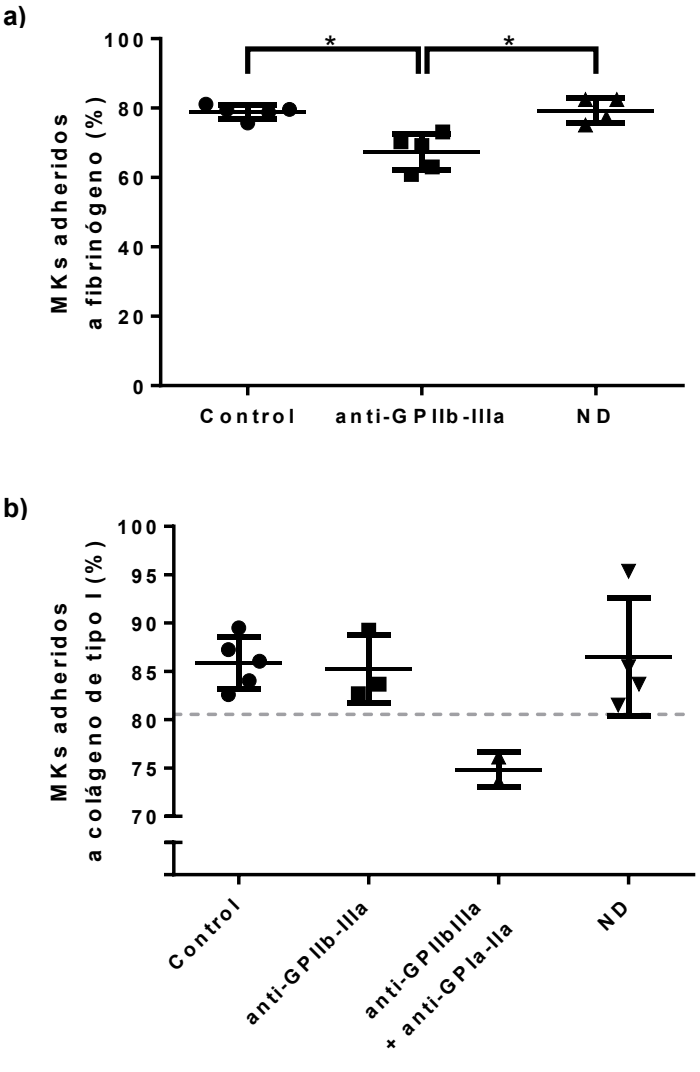


Figura 24. Efecto de las inmunoglobulinas G de PTI sobre la adhesión de MKs normales a proteínas de matriz extracelular (a) *Adhesión* de MKs al fibrinógeno. Luego de 16 horas de incubación en presencia de IgGs purificadas de PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIIb-IIIa (n=5), sin autoanticuerpos detectados (ND; n=4) o de controles (n=5), se calculó el porcentaje de MKs adheridos. (b) Adhesión de MKs al colágeno de tipo I. La metodología utilizada fue la misma que para el experimento sobre fibrinógeno. Para el análisis, la población conteniendo anti-GPIIb-IIIa se dividió en dos subpoblaciones: sin anticuerpos anti-GPIa-IIa (n=3) y con dichos autoanticuerpos (n=2). Las barras indican la media ± DE. Línea punteada: media ± 2 DE del grupo control (n=5) (límite de corte bajo el cual los valores se encuentran dentro del 2,1 % inferior, similar a una significación estadística con $p<0,05$). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en experimentos independientes. Prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples de Dunn. *$p<0,05$.

En concordancia con la anormal adhesión, el porcentaje de MKs en *spreading* incubados en presencia de los plasmas de PTI con los autoanticuerpos específicos también se vio alterado (Figuras 25a y 25b). En las figuras 25c y 25d se muestran fotografías representativas de las inmunofluorescencias de MKs cultivados sobre fibrinógeno en presencia de un plasma con anti-GPIIb-IIIa y sobre colágeno con un

plasma con anti-GPIa-IIa, respectivamente, junto a sus correspondientes controles. La cantidad de MKs en *spreading* sobre FvW resultó ser demasiado baja como para efectuar un análisis confiable.

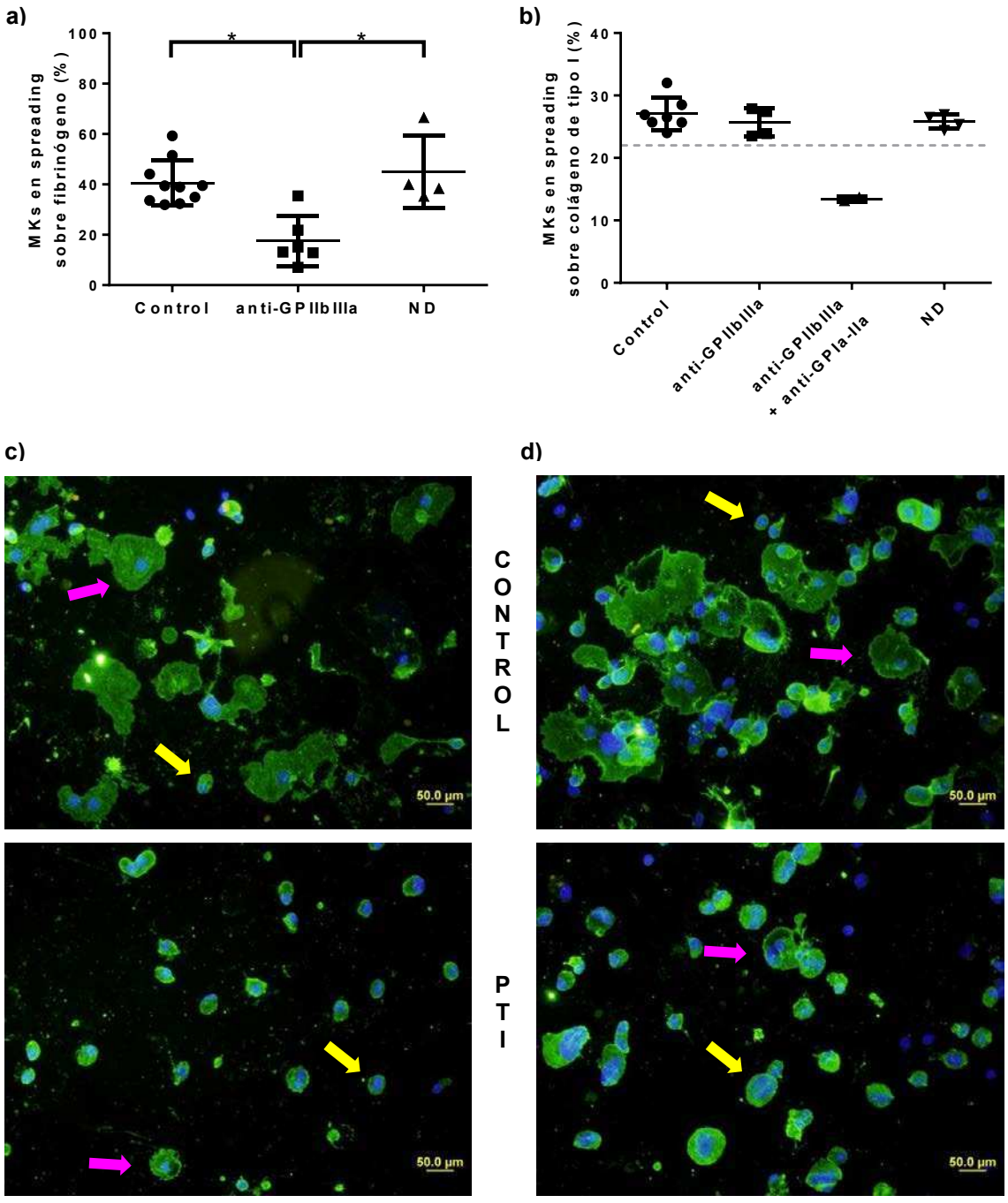


Figura 25. *Spreading* de MKs sobre fibrinógeno y colágeno de tipo I en presencia de plasmas de PTI con autoanticuerpos específicos. (a) MKs en *spreading* sobre fibrinógeno. Luego de 16 horas de cultivo en presencia de plasmas de PTI con anti-GPII-bIIIa (n=6), sin autoanticuerpos detectados (ND, n=4) o de controles (n=10), las células adheridas a los cubreobjetos recubiertos se fijaron, inmunomarcaron y se contabilizaron las células en *spreading*. (b) MKs en *spreading* sobre colágeno de tipo I. La metodología fue la misma que para el experimento sobre fibrinógeno. Para el análisis, la población conteniendo anti-GPIIb-IIIa se dividió en dos subpoblaciones: sin anticuerpos anti-GPIa-IIa (n=4) y con dichos autoanticuerpos (n=2). Se evaluaron además 4 plasmas sin autoanticuerpos detectados y 7

controles. (c) Ejemplos de campos representativos de MKs en *spreading* sobre fibrinógeno en presencia de un plasma control (arriba) o de un plasma de PTI con anti-GPIIb-IIIa (abajo). La flecha fucsia indica un MK en *spreading* mientras que la flecha amarilla señala a un MK adherido pero sin haber sufrido cambios morfológicos. (d) Ejemplos de campos representativos de MKs en *spreading* sobre colágeno de tipo I en presencia de un plasma control (arriba) o de un plasma de PTI con anti-GPIa-IIa (abajo). Muestras evaluadas por duplicado en experimentos independientes. Las barras indican la media ± DE. Línea punteada: media - 2 DE del grupo control, límite de corte bajo el cual los valores se encuentran dentro del 2,1 % inferior, similar a una significación estadística con $p<0,05$). Prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples de Dunn. *$p<0,05$.

4.4.4. Señalización río abajo de las GPs

Con el fin de estudiar de qué manera la unión de los autoanticuerpos afecta la vía de señalización río abajo de sus GPs blanco, MKs maduros normales se incubaron por 30 minutos con 10 % de plasmas de PTI. A continuación, y dependiendo del tipo de autoanticuerpo presente en cada muestra, los MKs se sembraron en pocillos recubiertos con el sustrato/ligando correspondiente, como se describió para los experimentos de adhesión y *spreading* (ítem 4.4.3).

Finalizada la incubación, las células se cosecharon y se obtuvieron las proteínas para realizar los estudios de western blot utilizando anticuerpos contra proteínas pertenecientes a la cascada de señalización río abajo de las tres GPs a analizar y contra β-actina como control de carga.

- Las muestras incubadas sobre fibrinógeno se revelaron con anti-β3, integrante de la GPIIb-IIIa, y con anti-β3 fosforilada (Tyr773) para evaluar su activación.
- Se sabe que la adhesión y el *spreading* de los MKs sobre colágeno de tipo I involucra la fosforilación de la cadena liviana de la miosina no muscular (MLC_2) (Malara y col., 2011) por lo que se utilizó un anticuerpo anti-MLC_2 fosforilada (Ser19) para evaluar las muestras estudiadas sobre esta proteína de matriz.
- Las muestras incubadas sobre FvW en presencia del péptido RGDS, bloqueante de la GPIIb-IIIa, se revelaron con un anticuerpo dirigido contra la familia de las quinasas Src en su forma fosforilada (Tyr418) que incluye a la proteína Lyn, una quinasa citosólica que se fosforila cuando se activa la señalización producto de la unión de la GPIb-IX-V al FvW.

Con el objeto de establecer el momento óptimo para la evaluación de las proteínas fosforiladas, en un ensayo preliminar se llevó a cabo una curva de tiempo de incubación utilizando un pool de plasmas recalcificados de controles normales. Se observó que la integrina β3 tiene un pico de fosforilación a los 60 segundos de estar en contacto con su ligando, el fibrinógeno (Figura 26a). Luego la fosforilación decae a los 120 y 300 segundos. Resultados similares su obtuvieron al evaluar la cinética de la

fosforilación de la MLC_2 (Figura 26b). Teniendo en cuenta que la participación de proteína Lyn en la señalización río debajo de la GPIb-IX-V es relativamente temprana, y no implica su síntesis de novo sino una modificación de un estado defosforilado a uno fosforilado, se decidió utilizar para su análisis el mismo tiempo de incubación que para las otras dos proteínas.

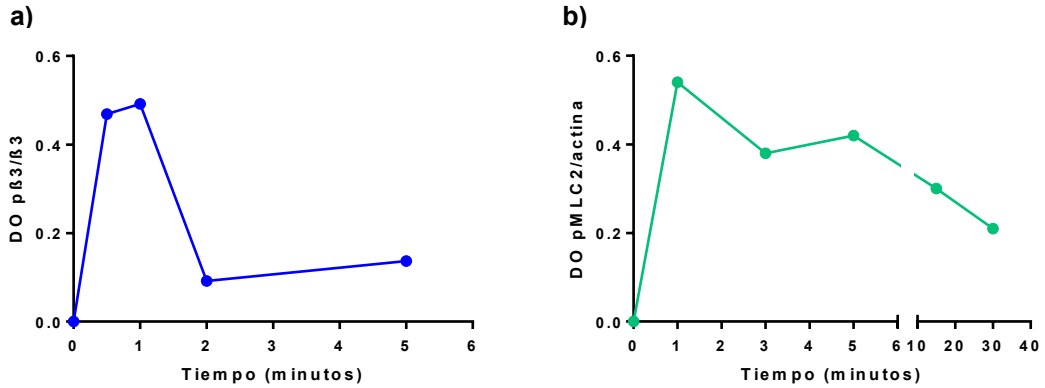


Figura 26. Cinética de fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de las GPs blanco de los autoanticuerpos de PTI. (a) Curva de fosforilación de la integrina β3. $1x10^6$ MKs maduros fueron incubados en presencia de un pool de plasmas controles recalcificados sobre fibrinógeno durante 30 segundos y 1, 2 y 5 minutos. Una vez extraídas las proteínas, se realizó un western-blot y se analizaron las bandas por densitometría óptica (DO), calculándose la relación entre fosfo-β3 y β3. (b) Curva de fosforilación de la cadena liviana de la miosina no muscular (MLC_2). Se procedió de la misma manera que en el punto (a) evaluándose la relación de intensidad de bandas de fosfo-MLC_2/β-actina, pero sobre colágeno de tipo I durante 1, 3, 5, 15, 30 minutos.

Habiendo establecido el tiempo óptimo para la evaluación de la fosforilación de las proteínas involucradas en la señalización de los receptores, se procedió a realizar los experimentos con las muestras de plasmas de PTI y de controles normales incubando los MKs sobre los ligandos correspondientes por un minuto. La fosforilación de la integrina β3 en MKs incubados sobre fibrinógeno se redujo en presencia de los 6 plasmas de pacientes con autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa (Figura 27a).

En los experimentos realizados sobre colágeno de tipo I, la fosforilación de la MLC_2 también se encontró disminuida en presencia de los plasmas de los 2 pacientes con auto-anticuerpos contra la GPIa-IIa (Figura 27b). El plasma del paciente con PTI con anticuerpos anti-GPIb-IX-V no afectó la fosforilación de Src, reflejando que la capacidad de los MKs de interactuar con FvW no se encuentra alterada (Figura 27c). Ejemplos representativos se muestran en las figuras 27 d-f.

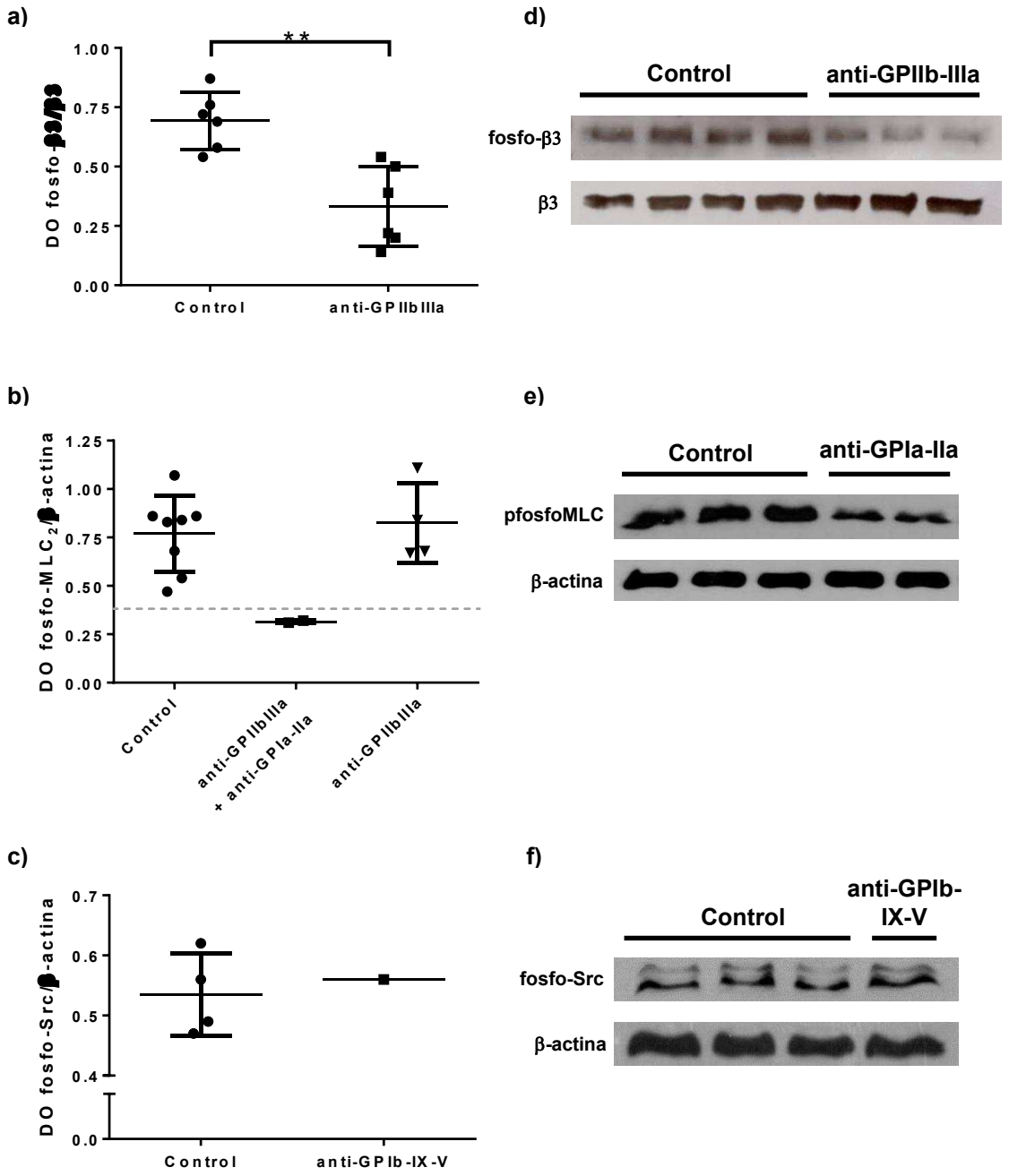


Figura 27. Efecto del plasma de PTI en la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de las GPs blanco de los autoanticuerpos. (a) Fosforilación de la integrina β3. 1x10^6 MKs maduros fueron incubados en presencia de 10 % de plasmas de pacientes con PTI conteniendo anticuerpos anti-GPIIb-IIIa (n=6), sin autoanticuerpos detectados (ND, n=4) o de controles normales (n=6) sobre fibrinógeno durante 1 minuto. Una vez extraídas las proteínas, se realizó un western blot, se revelaron las bandas y se analizaron por densitometría óptica (DO). Se grafica la relación de DO de la proteína fosforilada (fosfo-β3) en relación a la proteína total (β3). (b) Fosforilación de la cadena liviana de la miosina no muscular (MLC_2). Se procedió de la misma manera que en el punto (a) pero sobre colágeno de tipo I. Se estandarizó el nivel de fosforilación de MLC_2 por comparación con la proteína β-actina como control de carga. (c) Fosforilación de la quinasa perteneciente a la familia Src. Se procedió de la misma manera que en el punto (a) pero sobre FvW evaluando el único plasma con anti-GPIb-IX-V y 4 plasmas controles. (d-f) Fotografías de las proteínas reveladas en cada caso. Las barras indican la media ± DE. La línea punteada corresponde a la media - 2DE del grupo control (n=8). Prueba de Mann-Whitney. ** p<0,01.

4.5. Efecto del plasma de pacientes con PTI sobre la muerte de los MKs

4.5.1. Efecto directo de los plasmas de PTI en la sobrevida de MKs

Para investigar si la anormal producción plaquetaria en presencia de muestras de PTI se relaciona con un aumento de la apoptosis de MKs maduros, se evaluó la expresión de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática por unión de anexina V-FITC, la activación de las caspasas efectoras 3/7 y la condensación de la cromatina como marcadores de apoptosis.

La externalización de fosfatidilserina fue semejante en los MKs incubados con los plasmas de los pacientes respecto a aquellos cultivados con plasmas controles. Tampoco hubo diferencias en el porcentaje de MKs con caspasas 3 y 7, tanto en la evaluación realizada por citometría de flujo utilizando el inhibidor fluorescente FLICA (descripto en 3.2.13.2) como por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-caspasa 3 activada seguido de un anticuerpo secundario conjugado a rodamina. Sin embargo, se observó un ligero aumento de núcleos con cromatina condensada en MKs incubados con los plasmas de PTI (Figura 28a). Estos resultados concuerdan con el hecho de que los recuentos de células viables realizados a continuación del recuento de PPs, para calcular su porcentaje, no se vieron alterados en los cultivos en presencia de los plasmas de PTI (Figura 11b).

Por otra parte, en estos preparados se observaron con especial interés los MKs que estaban produciendo proplaquetas. Estas células no mostraron aumento de la activación de la caspasa 3 ni condensación nuclear ya sea en presencia de plasmas de PTI o de controles normales (Figura 28b). Estos resultados están en línea con el concepto de que los MKs deben estar completamente viables para ser capaces de producir PPs y plaquetas, como lo demuestran los resultados publicados por Josefsson y colaboradores (2011).

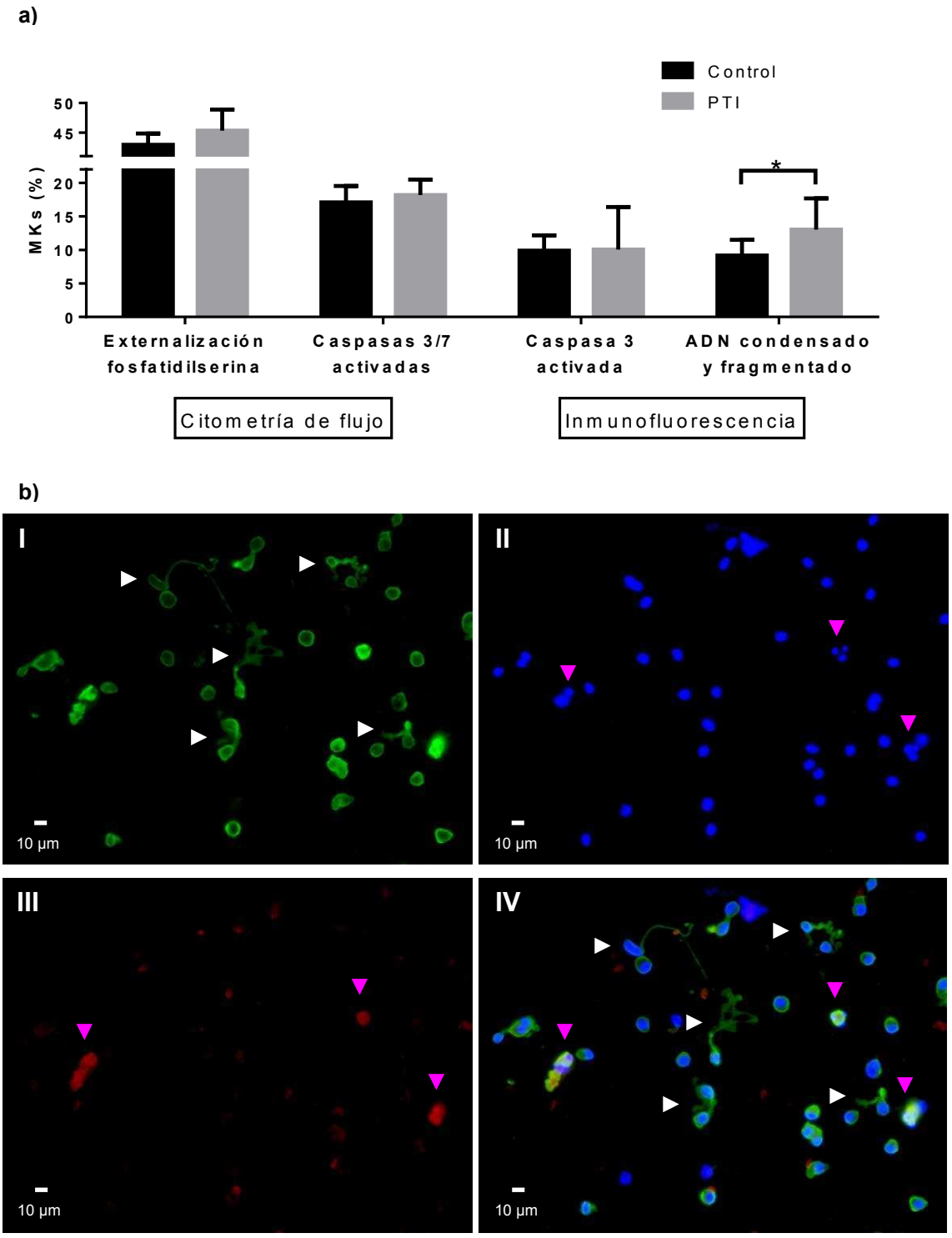


Figura 28. Efecto del plasma de PTI sobre la apoptosis de los MKs. (a) MKs maduros incubados durante 48 horas en presencia de 10 % de plasmas de PTI o de controles normales, fueron analizados para la externalización de fosfatidilserina por unión de anexina V-FITC (PTI, n=6; controles, n=6), la activación de las caspasas 3/7 por citometría de flujo utilizando el inhibidor fluorescente FLICA (FluorochromeLabelled Inhibitors of Caspases) (PTI, n=19; controles, n=16) y por inmunofluorescencia (IFI) con anti-CD61-FITC/Hoechst/anti- caspasa 3 activa seguido de un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (PTI, n=14; controles, n=14), como se describe en la sección de metodología. Se grafica la media ± DE. Las muestras se evaluaron, al menos, por duplicado en experimentos independientes utilizando diferentes cordones umbilicales. Prueba de Mann–Whitney. *p<0,05. (b) Fotografías representativas obtenidas con cámara PowerShot G6 (Canon) acoplada a microscopio de epi-iluminación Axiostar plus (Carl Zeiss) utilizando objetivo

de 40x. Se muestra la IFI de MKs incubados con un plasma recalcificado control (I) MKs teñidos con anti-CD-61-FITC (verde), (II) ADN por Hoechst (azul), (III) caspasa 3 activa (rojo), (IV) superposición de imágenes I-III (barra: 10 μm). Las cabezas de flecha blancas indican MKs con PPs y las fucsias señalan MKs con características apoptóticas.

4.5.2. Efecto del plasma de PTI como mediador de citotoxicidad sobre MKs

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (Goette y col., 2016), se demostró que los plasmas de PTI, así como las IgGs purificadas de estas muestras, inducen la expresión de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de plaquetas normales cuando éstas son incubadas con células CD3+ del mismo donante. Teniendo en cuenta que no se observó un claro efecto inductor de la apoptosis sobre los MKs normales en presencia de los plasmas de PTI, se incorporó al sistema células CD3+ normales para determinar si el efecto citotóxico observado en plaquetas se reproducía en megacariocitos. Para ello se utilizaron células CD3+ y MKs diferenciados a partir de progenitores hematopoyéticos CD34+, ambos provenientes de la misma muestra de sangre periférica de donantes sanos estimulados con factores de crecimiento para trasplante alogénico. Los MKs incubados en presencia de los plasmas de PTI no mostraron variación en la externalización de fosfatidilserina (unión de anexina V-FITC) ni en el nivel de caspasas 3/7 activadas (evaluado mediante el agregado de su inhibidor fluorescente, FLICA) respecto a lo observado en MKs incubados con plasmas controles (Figura 29, color violeta).

Con el objetivo de ampliar el espectro de células citotóxicas capaces de poner en evidencia el efecto dependiente de los autoanticuerpos, se incubaron a los MKs con el paquete completo de células mononucleares del mismo origen. En este caso, solamente se realizó la determinación con anexina V-FITC que tampoco arrojó diferencias estadísticas entre los MKs en presencia de los plasmas de PTI y los de controles sanos (Figura 29, color negro). Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo observado en plaquetas, los autoanticuerpos de PTI no afectan significativamente la sobrevida de los megacariocitos, ya sea por sí mismos, ejerciendo un efecto directo o mediando el efecto tóxico de células efectoras.

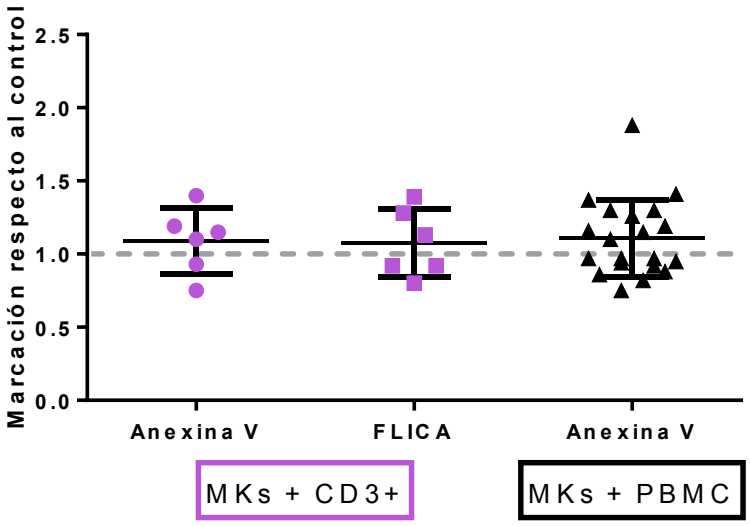


Figura 29. Efecto del plasma de PTI como mediador de citotoxicidad sobre MKs. Se grafica las veces de cambio respecto al promedio del grupo control. En violeta se muestran los resultados de MKs normales incubados con células CD3+ del mismo origen en presencia de 10 % de plasmas de PTI (n=6) y de controles normales (n=6). Se evaluaron 2 marcadores de apoptosis por citometría de flujo: la externalización de fosfatidilserina por unión de anexina V-FITC y la activación de las caspasas 3/7 mediante su inhibidor fluorescente (FLICA). En negro se exponen los resultados de MKs normales incubados con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del mismo origen, en presencia de plasmas de PTI (n=20) y de controles normales (n=18). En este caso se evaluó únicamente la externalización de fosfatidilserina por unión de anexina V-FITC. Las muestras se analizaron por simplificado a excepción del análisis con anexina V para los MKs cultivados con CD3+. Prueba t de Student y Mann-Whitney, según corresponda.

Discusión

5. Discusión

La mayoría de los estudios que investigan la fisiopatología de PTI apuntan a la eliminación de las plaquetas en sangre periférica, principalmente por efecto directo de los autoanticuerpos como principal mecanismo responsable de la trombocitopenia (Nieswandt y col., 2000; Webster y col, 2006; van Der Wal y col., 2012; Li y col., 2015). Sin embargo, en la década pasada, algunas publicaciones revelaron que existe también un defecto en la producción de plaquetas en estos pacientes. Dichos estudios se enfocaron en la evaluación del efecto del plasma de PTI sobre el desarrollo y la maduración de los megacariocitos y su principal descubrimiento fue que los autoanticuerpos de PTI inhiben la megacariopoyesis (Chang y col., 2003; McMillan y col., 2004). Apoyando este concepto, el análisis de la cinética plaquetaria en pacientes con PTI se demostró que además de la disminución de la sobrevida plaquetaria, la producción de plaquetas es subóptima (Barsam y col., 2011). El hecho de que la estirpe megacariocítica no suele encontrarse disminuida en la médula ósea de estos pacientes, lleva a plantear la hipótesis de que, si existiera una inhibición de la producción de plaquetas, sería a nivel de la formación de las mismas, o sea, en la etapa de trombopoyesis.

La fisiología de este proceso, caracterizado por la extensión de proplaquetas desde el cuerpo del megacariocito maduro, ha sido estudiada en profundidad en los últimos años pero nunca se ha analizado la existencia de una alteración en PTI, ni cómo podrían afectar directamente a este proceso los autoanticuerpos presentes en el plasma de los pacientes con esta enfermedad. En este trabajo se presenta evidencia que demuestra que los plasmas de PTI inducen alteraciones en la trombopoyesis y que los autoanticuerpos plasmáticos son en gran parte responsables de ello, afectando además otros aspectos de la fisiología de los megacariocitos. Estos descubrimientos podrían considerarse como nuevos mecanismos que contribuyen a explicar la trombocitopenia observada en los pacientes.

5.1. Los plasmas de PTI inhiben la formación de proplaquetas

Para evaluar el efecto del plasma de PTI sobre la formación de proplaquetas, en este proyecto se desarrolló un sistema que utiliza megacariocitos normales maduros, diferenciados a partir del cultivo de progenitores hematopoyéticos CD34+ de sangre de cordón umbilical, que son incubados en presencia de los plasmas cuyo efecto se

quiere estudiar, así como de plasmas provenientes de individuos sanos que conforman el grupo control.

Los plasmas de PTI redujeron significativamente la capacidad de los MKs de formar PPs en cultivos en suspensión. Este efecto inhibitorio dosis-dependiente comenzó a evidenciarse a las 24 horas del agregado de los plasmas pero se hizo más notorio al cabo de las 48 horas, momento en el cual se registró el máximo recuento de PPs. El hecho de que los recuentos de MKs totales realizados inmediatamente luego de contar los MKs produciendo PPs hayan sido similares en los cultivos tratados con plasma de pacientes y controles, sugiere que este defecto en la producción plaquetaria no guarda relación con la supervivencia de estas células. Además, los plasmas de PTI no afectaron la maduración de los MKs en la etapa final de su desarrollo, indicando que la significativa disminución en la trombopoyesis bajo estas condiciones experimentales no se debe a una reducción en la cantidad de células con capacidad trombopoyética, sino a un efecto directo de los plasmas de PTI sobre la formación de PPs.

La extrapolación de estos resultados obtenidos *in vitro* al escenario de PTI implicaría que, incluso en una médula ósea con MKs normales o aumentados, la inhibición de la producción de plaquetas tendría lugar en la etapa trombopoyética.

5.2. La inhibición en el número de MKs formando PPs estuvo asociada a la reducción de la complejidad de los procesos proplaquetarios

Cuando se analizó el efecto de los plasmas de PTI sobre la tormbopoyesis en suspensión, se observaron PPs con morfología aberrante en comparación a las producidas por los MKs incubados en presencia de las muestras de plasmas de controles. El análisis de las PPs mediante la utilización de un software especial para morfología celular, demostró que las muestras de plasma de los pacientes indujeron PPs más anchas y cortas, con un número menor de puntos de ramificación y de extremos con forma plaquetaria, es decir, PPs que globalmente presentaron un grado de complejidad significativamente menor que las observadas en presencia de los plasmas de controles.

Las alteraciones cuantitativas de la trombopoyesis inducidas por los plasmas de PTI estuvieron asociadas al grado de alteraciones morfológicas. En particular, en el grupo de plasmas con autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa, las 3 muestras que habían desarrollado una fuerte inhibición sobre la formación de PPs fueron los que tuvieron mayor cantidad de aberraciones morfológicas en los procesos proplaquetarios,

mientras que los MKs incubados con el plasma cuyo recuento de PPs había sido normal, formaron PPs complejas. Este mismo paralelismo se encontró en el caso de la muestra del paciente con autoanticuerpos anti-GPIa-IIa, dado que no presentó mayores alteraciones morfológicas y el porcentaje de PPs fue normal al evaluarse en suspensión. Una excepción a esta asociación, se observó en el caso del plasma conteniendo autoanticuerpos dirigidos contra la GPIb-IX-V, que a pesar de ejercer una marcada inhibición sobre la capacidad trombopoyética no afectó sustancialmente la morfología de las PPs, Es interesante mencionar que la deficiencia severa de la GPIb-IX-V en el síndrome de Bernard-Soulier se asocia con significativas alteraciones morfológicas en la estructura proplaquetaria (Balduini y col., 2011). Sin embargo, la presencia de los autoanticuerpos anti-GPIb-IX-V del paciente con PTI no reprodujo la anormalidad observada por deficiencia de la glicoproteína.

Esta asociación entre la inhibición de la formación de PPs y el grado de alteraciones morfológicas presentes en las mismas, también se observó en el grupo de plasmas de PTI a los que no se les detectaron autoanticuerpos, aunque uno de estos plasmas indujo PPs rudimentarias sin haber afectado cuantitativamente la trombopoyesis.

En el contexto medular, se podría suponer que cuando los MKs maduros entran en contacto con el nicho vascular en estos pacientes, durante el proceso de trombopoyesis se generan PPs rudimentarias con dificultad para elongarse y atravesar la barrera endotelial de los sinusoides que irrigan la médula ósea, lo que entorpecería la liberación de las plaquetas al torrente sanguíneo. A su vez, la baja complejidad de los procesos proplaquetarios supone que cada MK es capaz de generar menor cantidad de plaquetas que los normales.

En conclusión, estos resultados sugieren que, en los pacientes con PTI, no solo existiría un menor número de MKs capaces de producir PPs, sino también que estos tendrían un menor potencial de generación de plaquetas. Esta alteración tanto cuantitativa como cualitativa de la trombopoyesis sería otro de los factores que contribuyen a la trombocitopenia en PTI.

5.3. Los anticuerpos antiplaquetarios serían responsables de estas alteraciones

Al analizar los resultados de la formación de PPs en suspensión, se observó que la mayoría de los plasmas de PTI portadores de autoanticuerpos ejercieron una inhibición sobre la trombopoyesis. La corrección parcial de la producción proplaquetaria en presencia de los plasmas inmunodepletados con plaquetas

normales, así como la inhibición de la formación de PPs observada al incubar los MKs con la fracciones de inmunoglobulinas G purificadas, sugiere que efectivamente los autoanticuerpos anti-plaquetarios son en gran parte responsables de dicho efecto.

En nuestra cohorte de pacientes con PTI, el único plasma con autoanticuerpos contra la GPIb-IX-V indujo una profunda inhibición en la formación de PPs. Varias publicaciones han reportado evidencias del deterioro en la trombopoyesis en ausencia o disminución del complejo glicoproteico Ib-IX-V, como ocurre en el síndrome de Bernard-Soulier (Strassel y col., 2009) y la mutación de Bolzano (Balduini y col., 2009). Este deterioro también se ha asociado con deficiencia en filamina, una proteína estructural que une a la GPIbα con el citoesqueleto (Jurak Begonja y col., 2011; Kanaji y col., 2012). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la presencia de autoanticuerpos anti-GPIb-IX-V en PTI podría interferir con la función normal de la glicoproteina, conduciendo así a una trombopoyesis alterada. Sin embargo, es necesario estudiar un número mayor de muestras de pacientes portadores de este tipo de autoanticuerpos para lograr conclusiones definitivas.

Mientras que el papel de la GPIIb-IIIa en la función plaquetaria es indudablemente protagónico, su importancia en la trombopoyesis continúa siendo un tema de debate. Por un lado, los pacientes con trombastenia de Glanzmann, una patología en la que la GPIIb-IIIa se encuentra severamente disminuida, no muestran signos de trombocitopenia. Por otro lado, Takahashi y col. (1999) reportaron que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la GPIIb son capaces de inhibir la formación de PPs *in vitro.* A su vez, ratones αIIb -/- presentan una respuesta defectuosa a la administración de trombopoyetina, demostrando que, en determinadas circunstancias, este complejo glicoproteico podría desempeñar un papel significativo en la producción de plaquetas (Larson y Watson, 2006). Por último, se ha descubierto que la presencia de ciertas mutaciones en los genes ITGA2B e ITGB3 en pacientes con macrotrombocitopenia hereditaria que conducen a la activación parcial de la GPIIb-IIIa afecta la trombopoyesis (Ghevaert y col., 2008; Kunishima y col., 2011; Bury y col., 2012). En este estudio, no se observó activación constitutiva de la GPIIb-IIIa en presencia de las muestras de PTI portadoras de autoanticuerpos contra esta glicoproteína (Lev-Grodzielski y col., 2014). Por el contrario, la presencia de estos autoanticuerpos produjo inhibición en la formación de PPs que estuvo asociada con una alteración a nivel morfológico en 4 de 5 muestras. De esta manera, los resultados de este trabajo proporcionan otro escenario en el cual el normal funcionamiento de la GPIIb-IIIa resulta indispensable para el correcto desarrollo de la trombopoyesis

El plasma del paciente en el que se detectaron únicamente autoanticuerpos anti-GPIa-IIa no afectó ni el recuento ni la morfología de las PPs de los MKs cultivados en

suspensión o sobre fibrinógeno. Como se discutirá más adelante, la presencia de estos autoanticuerpos interfirió con la inhibición normal ejercida por el colágeno tipo I sobre la producción proplaquetaria. Estos resultados sugieren que la sola unión de los anti-GPIa-Ia a su blanco antigénico no altera la formación de PPs, sino que su efecto patogénico se pone de manifiesto sólo en presencia del ligando de esta glicoproteína.

Curiosamente, la inhibición de la trombopoyesis no se limitó a los plasmas de PTI portadores de autoanticuerpos. La mitad de los plasmas a los cuales no se les detectaron autoanticuerpos también redujeron la producción de PPs, e incluso mostrando alteraciones morfológicas. Otros factores presentes en estas muestras, incluyendo autoanticuerpos diferentes a los detectados y estudiados en esta investigación, podrían interferir con la generación de PPs. En estos pacientes, los autoanticuerpos circulantes no sólo podrían estar dirigidos contra blancos antigénicos diferentes a las GPs IIb-IIIa, Ib-IX-V y Ia-IIa, sino simplemente encontrarse en concentraciones inferiores al umbral de detección del equipo utilizado para su identificación.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, resulta lógico pensar que los mecanismos subyacentes que conducen a la reducción de la producción plaquetaria pueden no ser los mismos en la población de PTI, e incluso, que podrían diferir entre los pacientes con autoanticuerpos dirigidos contra los mismos blancos antigénicos. De esta forma, las diferencias en el tipo de anormalidad en la trombopoyesis podrían contribuir a las variaciones fenotípicas observadas en la población que padece esta enfermedad.

5.4. La interacción de los MKs con su entorno se vería afectada por los autoanticuerpos de PTI

De acuerdo con el modelo clásico de hematopoyesis, las células madre hematopoyéticas se someten a una auto-renovación a largo plazo dando lugar a células de todos los linajes sanguíneos, incluyendo MKs, cuyo objetivo final es llegar a los sinusoides medulares, formar PPs y liberar plaquetas al torrente sanguíneo. Durante este proceso dentro de la médula ósea, los MK se diferencian mientras viajan a través de microambientes medulares, o nichos, interactuando con células y componentes específicos de la matriz extracelular (Hartwig e Italiano, 2003; Pallotta y col. 2009; Malara y col., 2015).

Inicialmente los MKs crecen en el nicho osteoblástico, un ambiente enriquecido en colágeno de tipo I. La interacción de los MKs con esta proteína a través de su unión a

la GPIa-IIa, y la consecuente activación de la vía Rho-ROCK, inhibe la trombopoyesis (Sabri y col., 2004, Zou y col., 2009) impidiendo así la liberación prematura de plaquetas dentro de este compartimento medular. En este trabajo, se ha demostrado la pérdida de esta inhibición fisiológica en MKs cultivados sobre colágeno de tipo I en presencia de autoanticuerpos plasmáticos de PTI dirigidos contra la GPIa-IIa. Además, estas muestras también interfirieron en la adhesión y el *spreading* de los Mks al colágeno tipo I, y este efecto fue confirmado a nivel intracelular por la disminución en la fosforilación de la MLC_2 que señaliza río debajo de esta glicoproteína. Todos estos resultados apoyan firmemente la noción de que los autoanticuerpos anti-GPIa-IIa de pacientes con PTI afectan la forma en que los MKs interactúan con el colágeno de tipo I alterando la fisiología megacariocítica en el nicho osteoblástico. En este sentido, la interferencia de la unión de estas células al colágeno de tipo I y de la activación del receptor en estos pacientes, podría inducir una precoz trombopoyesis en el nicho osteoblástico en lugar de liberar las plaquetas en el lumen de los sinusoides medulares.

Impulsados por un gradiente quimioatractante de SDF-1, los MK migran desde el nicho osteoblástico al vascular (Pitchford y col., 2012, Niswander y col., 2014). Este último, un microambiente adecuado para la maduración de los MKs y la formación de PPs, representa una matriz extracelular compleja compuesta por varias proteínas incluyendo el fibrinógeno. Si bien, como se mencionó anteriormente, el papel de la GPIIb-IIIa durante la trombopoyesis no ha sido completamente aclarado (Caen y col., 1966, Prandini y col., 1996, Takahashi y col., 1999, Eto y col., 2002), se sabe que la unión del fibrinógeno a este receptor estimula la producción de plaquetas (Larson y Watson, 2006, Balduini y col., 2008). En este trabajo, los resultados que demuestran a) la disminución de la trombopoyesis sobre fibrinógeno, b) la disminución en la unión de PAC-1 y c) la deficiencia en la capacidad de adhesión y *spreading* sobre esta proteína de matriz en MKs incubados en presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la GPIIb-IIIa, exponen una fuerte evidencia acerca de que estos autoanticuerpos dificultan la interacción entre el fibrinógeno y su receptor. Más aún, se ha descripto que la activación de la señalización río debajo de esta glicoproteína, a través de las quinasas de la familia Src, desencadena la trombopoyesis (Mazharian y col., 2010, 2011). Nuestros resultados demuestran que los autoanticuerpos impiden la fosforilación de la integrina β3, afectando la capacidad de activar esta vía estimuladora de la producción plaquetaria. Estas alteraciones provocadas por los autoanticuerpos contra la GPIIb-IIIa, podrían conducir a defectos en la formación de PPs en el nicho vascular de la médula ósea en los pacientes con PTI.

Además del fibrinógeno, la compleja matriz extracelular presente en el nicho vascular contiene varias moléculas entre las que se encuentra el factor von Willebrand (FvW), una proteína multimérica sintetizada por las células endoteliales y almacenada en cuerpos de Weibel-palade desde donde se libera a circulación (Sporn y col., 1986) y al subendotelio (Denis y col. 1993). Se ha demostrado que la interacción de los MKs maduros con este ligando a través de la GPIb-IX-V tiene un importante papel en la fase final de la producción plaquetaria (Dunois-Lardé y col., 2009; Poirault-Chassac y col., 2013). En este sentido, Nurden y colaboradores (2010) describieron alteraciones en la formación de PPs cuando esta interacción es patológica. En este trabajo, no se observó disminución en la adhesión de los MKs al FvW en presencia de los auntoanticuerpos dirigidos contra la GPIb-IX-V pero sí una marcada inhibición sobre la trombopoyesis en suspensión. Este efecto inhibitorio se reprodujo en presencia de la fracción purificada de IgG y se revirtió al incubar los MKs con el plasma inmunodepletado. Estos resultados ponen de manifiesto que los autoanticuerpos anti-GPIb-IX-V afectan la capacidad trombopoyética de los MKs y proporcionan una evidencia más a la importancia de esta glicoproteína en la trombopoyesis. Sin duda, el análisis del comportamiento de los MKs incubados sobre FvW en presencia de autoanticuerpos anti-GPIb-IX-V, aportará datos útiles para continuar descifrando el papel de los autoanticuerpos de PTI en la formación de plaquetas.

5.5. Alteraciones producidas por los plasmas carentes de autoanticuerpos

Como se ha mencionado anteriormente, el hallazgo de inhibición de la trombopoyesis, así como la presencia de PPs con alteraciones morfológicas en MKs incubados con plasmas de PTI en los que no se detectaron ninguno de los anticuerpos medidos (anti-GPIIb-IIIa, Ib-IX-V y Ia-IIa), podría sugerir que estos autoanticuerpos se encuentran en concentraciones más bajas que el umbral de detección del equipo utilizado. Alternativamente, se podría hipotetizar la existencia de otros factores presentes en estas muestras, incluyendo autoanticuerpos dirigidos contra blancos diferentes a los estudiados, como los responsables del efecto observado.

Se destaca el caso de 2 pacientes cuyos plasmas, así como la fracción de inmunoglobulinas G, produjeron una marcada inhibición en la formación de PPs en suspensión. El plasma de uno de ellos, el paciente 21, mantuvo la capacidad de inhibición de las PPs al tiempo que indujo un grado elevado de alteraciones morfológicas en las mismas al evaluarlo sobre fibrinógeno. Estos resultados apuntarían a la existencia de autoanctiuerpos anti-GPIIbIIIa en esta muestra. En

cambio, el plasma del paciente 17 no afectó la trombopoyesis sobre fibrinógeno. Además, este plasma fue evaluado sobre diferentes matrices y tampoco tuvo un efecto en la adhesión y *spreading* de los MKs sobre fibrinógeno, colágeno de tipo I o FvW, así como en la activación de las vías de señalización intracelular sobre estos ligandos. Por lo tanto, el paciente 17 podría ser portador de autoanticuerpos dirigidos contra blancos antigénicos distintos a los estudiados en este trabajo.

La búsqueda de nuevos blancos antigénicos, así como de autoanticuerpos en baja concentración, se comenzó a realizar en algunas de las muestras incluidas en este trabajo. Sin embargo, dada la complejidad de la metodologías necesarias para llevarla a cabo (separación de complejos antígeno-anticuerpo, centrifugaciones diferenciales, MIAPA -Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens-, MALDI-TOF -Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-, etc.), que en algunos casos requería que se desarrollara íntegramente fuera de nuestro laboratorio, esta rama de la investigación no se incluyó en la presente tesis doctoral.

5.6. Sobrevida de los MKs en PTI

Los estudios de Josefsson y col. (2011) demostraron que la maquinaria apoptótica es dispensable para la formación de PPs, mientras que su activación puede perjudicar este proceso. En concordancia con esos datos, en el presente trabajo se observó que los Mks produciendo proplaquetas no expresan caspasa 3 activa en nuestras condiciones experimentales, reforzando el concepto de que la producción de proplaquetas se lleva a cabo en megacariocitos completamente viables.

Como se ha mencionado anteriormente, el papel de la apoptosis de los MKs en PTI es controvertido. En este sentido, este trabajo propuso evaluar la presencia de distintos marcadores de apoptosis en MKs incubados con plasma de PTI durante la etapa final de su desarrollo, utilizando las mismas condiciones en las que se evaluó la formación de PPs. No se observó un aumento del nivel de activación de las caspasas efectoras en las células en presencia de las muestras de pacientes, aunque se encontró un ligero aumento en la condensación y fragmentación de la cromatina. Además, las células expuestas a las muestras de pacientes no sufrieron incremento alguno en la expresión de fosfatidilserina respecto de las expuestas a las muestras controles. Estos resultados concuerdan con los ya publicados por Yang y colaboradores (2010), quienes demostraron que los MKs incubados con plasmas de PTI no incrementan la expresión de otros marcadores de apoptosis como TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) o Bcl-xL.

Aparte de la eliminación por el sistema retículo-endotelial de las plaquetas con autoanticuerpos unidos a su superficie, se han descripto reacciones de citotoxicidad plaquetaria mediadas por linfocitos CD3+CD8+ de PTI (Olsson y col., 2003; Zhao y col., 2008). Además, nuestro grupo de investigación presentó evidencia de que los autoanticuerpos de PTI pueden inducir apoptosis plaquetaria a través de un mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos ejercida por una fracción de células CD3+ (Goette y col., 2016). Teniendo en cuenta que los plasmas de PTI no indujeron por si mismos apoptosis sobre los MKs maduros normales, se evaluó la posibilidad de que el agregado de células efectoras normales, provenientes del mismo individuo, pusiera de manifiesto un efecto citotóxico mediado por los autoanticuerpos, del mismo modo que el observado en plaquetas. Sin embargo, en estas condiciones, los plasmas de PTI no produjeron aumento de los marcadores apoptóticos en los MKs, ya sea al ser incubados con células CD3+, como con la fracción de células mononucleares del mismo origen.

A pesar de que globalmente no se observó un incremento en la exposición de fosfatidilserina en los MKs cultivados con células mononucleares en presencia de los plasmas de PTI, en el caso particular del plasma del paciente 28, portador de autoanticuerpos anti- GPIIb-IIIa y GPIa-IIa, la expresión de este marcardor apoptótico se duplicó en relación al grupo control y al resto de los plasmas de PTI, incluyendo los demás pacientes con anticuerpos contra las mismas glicoproteínas. Estos datos aportan una evidencia más de la heterogeneidad de los mecanismos patológicos en PTI, que pueden variar aún en presencia de la misma clase de autoanticuerpos.

En conclusión, aunque el daño de los MKs podría desempeñar un papel en la patogénesis de la PTI en el entorno *in vivo*, como lo demuestran las características morfológicas de la médula ósea (Houwerzijl y col., 2004), nuestros resultados sugieren que las alteraciones sobre la trombopoyesis encontradas en este estudio no se pueden atribuir a la disminución en el número de MKs viables, sino que son la consecuencia de un efecto específico sobre los mecanismos relacionados a este proceso. Tanto la inhibición de la formación de proplaquetas como la ausencia de apoptosis en MKs incubados con muestras de PTI fueron confirmadas por otros investigadores (Iraqi y col., 2015) con posterioridad a la publicación de nuestro grupo (Lev-Grodzielski y col., 2014).

5.7. Relación entre la inhibición de la trombopoyesis y las características clínicas de los pacientes con PTI

Todos los pacientes con PTI tuvieron recuentos plaquetarios inferiores a $90x10^9$/L al momento de su inclusión en el estudio. Si bien el defecto en la trombopoyesis descripto in vitro en este trabajo, podría ser un mecanismo de trombocitopenia que tiene lugar en la médula ósea de los pacientes con PTI, la ausencia de una clara correlación entre el recuento plaquetario en sangre periférica y los recuentos de PPs en suspensión en presencia de los correspondientes plasmas recalcificados, demuestra la existencia de más de un mecanismo subyacente y pone de manifiesto la compleja fisiopatología de esta enfermedad. En este sentido, la eliminación de plaquetas circulantes, el defecto en la megacariopoyesis y la alteración a nivel de la trombopoyesis descripta en el presente trabajo, constituyen mecanismos específicos involucrados en el fenotipo de este desorden inmunológico. El grado en que cada uno de ellos contribuye a la trombocitopenia en los pacientes en forma individual podría variar, lo que permitiría explicar la heterogeneidad típica de la PTI en cuanto a la sintomatología y la respuesta al tratamiento.

En relación con las manifestaciones hemorrágicas, se observó mayor inhibición de la trombopoyesis en muestras de pacientes a medida que las manifestaciones de sangrado son más severas (puntajes de sangrado más altos). El puntaje de sangrado es un índicador del historial de manifestaciones hemorrágicas y suele estar relacionado con la severidad de la trombocitopenia. Sin embargo, no se observaron diferencias en el recuento plaquetario en los pacientes agrupados según su puntaje de sangrado, ya sea incluyendo a todos los pacientes enrolados en este trabajo, o sólo a los que se encontraban sin tratamiento. Este hallazgo conduce a pensar que el grado de las manifestaciones hemorrágicas en este grupo no depende únicamente de la cantidad de plaquetas circulantes sino también podría reflejar una deficiencia en la capacidad de las plaquetas de llevar a cabo sus funciones hemostáticas correctamente. En este sentido, estudios en pacientes pediátricos con PTI crónica mostraron que la tendencia al sangrado puede ser distinta en pacientes con recuentos de plaquetas similares, lo que dificulta las decisiones terapéuticas. Por otro lado, se demostró que los pacientes con un fenotipo de sangrado severo presentan defectos plaquetarios funcionales (van Bladel y col., 2014; Frelinger y col., 2015). A su vez, estudios realizados en nuestro laboratorio (Goette y col., 2016) analizando la función plaquetaria de algunos de los pacientes incluidos en esta tesis, demostraron que la unión de PAC-1 a plaquetas de PTI podría estar alterada en pacientes con

manifestaciones hemorrágicas más severas (puntaje de sangrado=2), aunque es necesario extender la población evaluada para confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, la presencia de autoanticuerpos plasmáticos se observó con mayor frecuencia en las muestras de pacientes con algún grado de manifestaciones hemorrágicas (puntajes de sangrado>*0)*, mientras que no se hallaron en ninguno de los 4 pacientes con puntaje de sangrado=0. Estos datos sugerirían que los autoanticuerpos antiplaquetarios, además de alterar la producción de PPs, podrían interferir con la funcionalidad de los receptores plaquetarios, afectando de esta manera la activación de las plaquetas con la consiguiente falla a nivel hemostático. Para poner a prueba esta hipótesis, deberían extenderse los estudios sobre funcionalidad plaquetaria, no sólo en plaquetas autólogas, sino también en plaquetas normales en presencia de los plasmas de PTI y de las fracciones purificadas de inmunoglobulinas.

No se encontraron diferencias en la formación de PPs entre MKs incubados con muestras del grupo de pacientes que no estaban bajo tratamiento y los que sí lo estaban. Cabe destacar que ambos grupos presentaron recuentos de plaquetas similares dado que el tratamiento fue dirigido sólo a lograr un recuento plaquetario seguro (a partir de 20-30x10^9/L).

Una evaluación secuencial de 12 pacientes a partir de muestras obtenidas en diferentes momentos, demostró que el tratamiento con inmunomoduladores no modificó la capacidad de los MKs de producir PPs en suspensión. Esto podría deberse a que las dosis utilizadas fueron eficaces para atenuar la intolerancia inmunológica disminuyendo el *clearence* plaquetario pero no para disminuir la producción de autoanticuerpos lo suficiente como para revertir la inhibición sobre la trombopoyesis.

El aumento en el recuento de proplaquetas observado en presencia de una muestra de PTI luego de la infusión de Ig EV, un inmunomodulador con múltiples mecanismos de acción (Schwab y Nimmerjahn, 2013; Mitrevski y col., 2015), sugiere que este tratamiento fue efectivo para disminuir la producción de autoanticuerpos, favoreciendo la trombopoyesis y por consiguiente el aumento del recuento plaquetario en sangre periférica.

En el caso del tratamiento con miméticos de trombopoyetina, su principal acción es la estimulación de la megacariopoyesis, aunque se ha sugerido que también pueden tener un efecto inmunomodulador (Gudbrandsdottir y col., 2016; Liu y col., 2016). En el estudio secuencial de un paciente, se observó que en presencia de la muestras tomada bajo tratamiento con eltrombopag, hubo un aumento de la producción de proplaquetas. Di Buduo y colaboradores (2016) demostraron, en estudios *in vitro*, que eltrombopag produce aumento del recuento de proplaquetas. En

base a esta evidencia, el aumento de la trombopoyesis observado en presencia del plasma obtenido durante el tratamiento con esta droga podría atribuirse a la acción de la droga remanente en la muestra evaluada. Alternativamente, no se puede descartar que un posible efecto inmunomodulador de eltrombopag *in vivo* produzca una disminución de los niveles de autoanticuerpos circulantes y por ende, en la muestra de plasma.

Como se muestra por primera vez en este estudio, la producción reducida de plaquetas es causada no sólo por la inhibición sobre la megacariopoyesis mediada por autoinmunidad (McMillan y col., 2004), sino también, por una alteración en la formación de PPs en los MKs maduros. Además, los autoanticuerpos de PTI interfieren con otras funciones biológicas de los MKs, como su unión e interacción con distintas proteínas de matriz de la médula ósea, lo que podría contribuir al defecto en la producción de plaquetas en esta patología. Las diferencias en la contribución de cada uno de estos mecanismos a la trombocitopenia podrían influir en la respuesta a los diferentes tratamientos, ya sea, aquellos dirigidos a aumentar la producción de plaquetas o a bloquear la destrucción de las mismas.

Uno de los aspectos que refleja la heterogeneidad característica de la PTI es la detección de autoanticuerpos, ya que sólo están presentes en una fracción de pacientes y sus blancos moleculares son diversos. Las diferencias en la concentración, así como en sus características particulares (la especificidad del epitope y el grado de afinidad), podrían determinar su capacidad para alterar la producción de PPs.

Conclusiones

6. Conclusiones

En el presente trabajo se ha estudiado si existen alteraciones en la etapa de trombopoyesis en pacientes con PTI, que pudieran contribuir a la trombocitopenia en esta patología. A continuación se detallan las principales conclusiones:

- La inhibición de la trombopoyesis producida por los plasmas de PTI podría constituir un factor contribuyente a la trombocitopenia en esta patología. Considerando que con frecuencia, el número de megacariocitos en médula ósea de PTI se encuentra normal o aumentado, la alteración en la etapa de producción plaquetaria descrita en este trabajo podría ser más relevante que la inhibición de la megacariopoyesis reportada con anterioridad.

- Las alteraciones morfológicas observadas en las proplaquetas que se desarrollan en presencia de los plasmas de PTI, sugieren que, en el contexto del nicho vascular medular, en donde las proplaquetas deben atravesar la pared endotelial para liberar plaquetas a la circulación, estas estructuras podrían no ser aptas para cumplir adecuadamente con su función fisiológica. Este podría ser un factor más que contribuye a la disminución del número de plaquetas circulantes.

- Del mismo modo que se identificaron a los autoanticuerpos como responsables de la inhibición de la megacariopoyesis, en el presente estudio se demostró que los autoanticuerpos de PTI interfieren en la producción de proplaquetas. En este sentido, los resultados obtenidos indican que los distintos autoanticuerpos no actúan a través de los mismos mecanismos patogénicos. Mientras que los autoanticuerpos dirigidos contra las GPIb-IX-V y GPIIb-IIIa pueden producir inhibición de la formación de proplaquetas, aquellos dirigidos contra el receptor de colágeno tipo I, la GPIa-IIa, interrumpen la inhibición fisiológica del colágeno sobre la trombopoyesis, lo que podría redundar en la liberación prematura de plaquetas en el nicho osteoblástico.

- El efecto inhibitorio sobre la producción de proplaquetas observado en presencia de plasma de pacientes en los que no se detectaron autoanticuerpos sugiere la existencia de otros factores plasmáticos, incluyendo autoanticuerpos dirigidos contra diferentes blancos antigénicos, que serían los responsables de inducir efectos similares. Los resultados obtenidos garantizan estudios posteriores en esta línea de investigación.

- Si bien existen ciertas evidencias de que los megacariocitos de PTI sufren eventos de apoptosis o parapoptosis, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la sobrevida de los MKs maduros no se ve afectada en presencia de plasmas de PTI, sugiriendo que la alteración en la producción plaquetaria no se debe al aumento de la apoptosis de estas células, sino más bien a alteraciones inherentes al proceso de trombopoyesis.

- Los resultados de este trabajo demuestran que además de la inhibición de la producción de proplaquetas, la interferencia de la unión entre los MKs y las proteínas de matriz extracelular producida por los autoanticuerpos, puede afectar otras funciones fisiológicas como la adhesión, el *spreading* y la activación de señales intracelulares claves para la actividad de los megacariocitos.

- La falta de correlación entre la producción de proplaquetas y el recuento plaquetario en sangre periférica de los pacientes, confirma que la trombocitopenia se produce por la suma de más de un mecanismo patogénico. Por otro lado, la inhibición de la trombopoyesis se asoció tanto con la presencia de autoanticuerpos como con el grado de manifestaciones hemorrágicas. El estudio de la función plaquetaria en esta población de pacientes sería de interés para definir si el sangrado es consecuencia de defectos en la activación de plaquetas por acción de los autoanticuerpos.

El conocimiento cabal de los mecanismos patogénicos que inducen el desarrollo de la trombocitopenia autoinmune es de fundamental importancia para la optimización de los tratamientos y la posible generación de terapias efectivas en estos pacientes, en especial, en aquellos refractarios a los tratamientos convencionales. Los hallazgos presentados en este estudio contribuyen al esclarecimiento de la fisiopatología de esta compleja enfermedad permitiendo, también, profundizar los conocimientos sobre los mecanismos normales que regulan la producción plaquetaria.

Bibliografía

Bilbiografía

- Adibi P y col. Population-based platelet reference values for an Iranian population. Int J Lab Hematol 2007; 29: 195-9.
- Adolfsson J y col. Identification of Flt31 lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell 2005; 121(2): 295-306.
- Akashi K y col. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 2000; 404(6774): 193-7.
- Arai F y col. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004; 118: 149-61.
- Arai F y Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. Ann. NY Acad Sci 2007; 1106: 41-53.
- Avecilla ST y col. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. Nat Med 2004; 10: 64-71.
- Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. J Clin Pathol 1996; 49: 664-6.
- Balduini A y col. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. J Thromb Haemost 2008; 6: 1900-7.
- Balduini A y col. Proplatelet formation in heterozygous Bernard–Soulier syndrome type Bolzano. J Thromb Haemost 2009; 7: 478-84.
- Balduini A y col. Megakaryocytes derived from patients with the classical form of Bernard-Soulier syndrome show no ability to extend proplatelets in vitro. Platelets 2011; 22: 308-11.
- Ballem PJ y col. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. J Clin Invest 1987; 80: 33-40.
- Barsam SJ y col. Platelet production and platelet destruction: assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. Blood 2011; 117: 5723-32.
- Beardsley DS y Ertem M. Platelet Autoantibodies in Immune Thrombocytopenic Purpura. Transfus Sci Vol 1998; 19(3): 237-44.
- Becker RP y De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. Am J Anat 1976; 145(2): 183-205.
- Behnke O. An electron microscope study of the rat megacaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. J Ultrastruct Res 1969; 26: 111-29.
- Bender M y col. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent oncytoplasmic dynein. Blood 2015; 125(5): 860-8.
- Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. L'Osservatore 1881; 17 :785-7.
- Blair PA y col. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy indi viduals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity 2010; 1: 129-40.
- Boylan B y col. An acquired platelet disorder caused by autoantibodymediated clearance of the GPVI/FcR gamma-chain complex from the human platelet surface. Blood 2004; 104: 1350-5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
- Branehog I y col. Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Br J Haematol 1974; 27: 127-43.
- Burrows RF y Kelton JG. Incidentally detected thrombocytopenia in healthy mothers and their infants. N Engl J Med 1988; 319: 142-5.
- Bury L y col. Outside-in signalling generated by a constitutively activated integrin aIIb3 impairs proplatelet formation in human megakaryocytes. PLos ONE 2012; 7: e34449.

- Bussel JB y col. Safety and efficacy of long- term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. Blood 2012; 113(10): 2161-73.
- Caen JP y col. Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count: I. Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients). Am J Med 1966; 41:4-26.
- Calvi LM y col. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003; 425(6960): 841-6.
- Camargos Rocha AM y col. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia. Haematologica 2011; 96(10): 1560-4.
- Cao J y col. Elevated plasma IL-22 levels correlated with Th1 and Th22 cells in patients with immune thrombocytopenia. Clinical Immunology 2011; 141: 121-3.
- Cardier JE y Barbera-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. Hepatology 1997; 26: 165-75.
- Chan H y col. The igg subclasses of plateletassociated autoantibodies directed against platelet glycoproteins IIb/IIIa in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2003; 122: 818-24.
- Chang M y col. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. Blood 2003; 102: 887-95.
- Chang Y y col. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. Blood 2007; 109: 4229-36.
- Choi ES y col. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. Blood 1995; 85: 402-13.
- Choi E. Regulation of proplatelet and platelet formation in vitro. Capítulo 17 en Thrombopoiesis and Thrombopoietins: Molecular, Cellular, Pre Clinical, and Clinical Biology. In: Kuter D, Hunt P, Sheridan WP, Zucker-Franklin D, editors. 1997; 271-84.
- Cines DB y col. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. Presse Med 2014; 43: e49-e59.
- Cooper N. Intravenous immunoglobulin and anti-RhD therapy in the management of immune thrombocytopenia. Hematol Oncol Clin N Am 2009; 23: 1317-2.
- Couzi L y col. Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human γδ T cells expressing CD16 (FcγRIIIa). Blood 2012; 119: 1418-27.
- Craig N y col. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. Blood 2014; 123(18): 2759-67.
- Cramer EM y col. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. Blood 1997; 89: 2336-46.
- Daimon T y Gotoh Y. Cytochemical evidence of the origin of the dense tubular system in the mouse platelet. Histochem 1982; 76: 189-96.
- Dameshek W y Miller EB. The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. Blood 1946; 1: 27-51.
- De Botton S y col. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. Blood 2002; 100: 1310-7.
- Debili N y col. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. Blood 1996; 88: 1284-96.
- Denis C y col. Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen. Arterioscler Thromb 1993; 13: 398-406.
- Denys H. Etudes sur la coagulation du sang dans un cas de purpura avec diminution consideȼrable des plaquettes. La Cellule 1887; 3: 445-62.
- Di Buduo CA y col. Revealing eltrombopag's promotion of human megakaryopoiesis through AKT/ERK-dependent pathway activation. Haematologica 2016; 101(12): 1479-88.
- Dunois-Lardé CC y col. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. Blood 2009; 114: 1875-83.
- Dzierzak E y Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. Nat Immunol 2008; 9: 129-36.
- Ebbe S y Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. Blood 1965; 26: 20-34.
- Ebbe S. Biology of megakaryocytes. Prog Hemost Thromb 1976; 3: 211-29.

- Eto K y col. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 12819-24.
- Evans RS y col. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia; evidence for a common etiology. AMA Archives of Internal Medicine 1951; 87: 48-65.
- Filion MC y col. Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy. Eur J Immunol 1995; 25: 3123-7.
- Fliedner TM y col. Bone marrow structure and its possible significance for hematopoietic cell renewal. Ann N Y Acad Sci 1985; 459: 73-84.
- Fogarty PF y col. T cell receptor VB repertoire diversity in patients with immune thrombocytopenia following splenectomy. Clin Exp Immunol 2003; 133: 461-6.
- Fondevila C y col. Trombocitopenia Inmune en Guías de Diagnóstico y Tratamiento. Sociedad Argentina de Hematología 2015; 267-90.
- Forsberg EC y col. New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt31 multipotent hematopoietic progenitors. Cell 2006; 126(2): 415-26.
- Frank E. Die essentielle thrombopenie (Konstitutionelle Purpura-Pseudohämophilie), I: Klinische Bild. Berliner klinische Wochenschrift 1915; 52: 454-8.
- Frederiksen H y Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic Purpura in adults increases with age. Blood 1999; 94: 909-13.
- Frelinger AL y col. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. Blood 2015;126(7): 873-9.
- Fuchs E y col. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell 2004; 116(6): 769-78.
- Gay LJ y Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. Nat Rev Cancer 2011; 11(2): 123-34.
- Geddis AE y Kaushansky K. Inherited thrombocytopenias: toward a molecular understanding of disorders of platelet production. Curr Opin Pediatr 2004; 16: 15-22.
- Ghevaert C y col. A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the alphaIIbbeta3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. Blood 2008; 111: 3407-14.
- Goette NP y col. Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-Antibodies. PLoS ONE 2016; 11 (8): e0160563.
- Golde D. The stem cell. Sci Am 1991; 265: 86-93.
- Gong JK. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. Science 1978; 199: 1443-5.
- Greenbaum A y col. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. Nature 2013; 495(7440): 227-30.
- Gudbrandsdottir S y col. Effect of thrombopoietin-receptor agonists on circulating cytokine and chemokine levels in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP). Platelets 2016; DOI: 10.1080/09537104.2016.1235691.
- Handagama PJ y col. In vitro platelet release by rat megakaryocytes: effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents. Am J Vet Res 1987; 48: 1142-6.
- Handagama P y col. Incorporation of circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. PNAS 1987; 84: 861-5.
- Hanoun M y Frenette PS. This niche is a maze; an amazing niche. Cell Stem Cell 2013; 12(4): 391-2.
- Harker LA y Finch CA. Thrombokinetics in man. J Clin Invest 1969; 48: 963-74.
- Harker LA. Thrombokinetics in idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1970; 19: 95-104.
- Harker LA y Slichter SJ. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. N Engl J Med 1972; 287: 155-9.
- Harrington WJ y col. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1951; 38: 1-10.
- Hartwig JH e Italiano JE. The birth of the platelet. J Thromb Haemost 2003; 1(7): 1580-6.
- Hartwig JH e Italiano JE. Cytoskeletal mechanisms for platelet production. Blood Cells Mol Dis 2006; 36: 99-103.

- He R y col. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1994; 83: 1024-32.
- Heazlewood SY y col. Megakaryocytes co-localise with hemopoietic stem cells and release cytokines that up-regulate stem cell proliferation. Stem Cell Res 2013; 11(2): 782-92.
- Heijnen HF y col. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. Blood 1998; 91: 2313-25.
- Heissig B y col. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. Cell 2002; 109: 625–37.
- Heyns AdP y col. Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous 111In-labeled platelets and homologous 51Cr-labeled platelets differ. Blood 1986; 67: 86-92.
- Ho-Tin-noé B y col. How platelets safeguard vascular integrity. J Thromb Haemost 2011; 9(s1): 56-65.
- Houwerzijl EJ y col. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2004; 103: 500-6.
- Howell WH y Donahue DD. The production of blood platelets in the lungs. J Exp Med 1937; 65: 177-203.
- Hunt P. A bipotential megakaryocyte/erythrocyte progenitor cell: the link between erythropoiesis and megakaryopoiesis becomes stronger. J Lab Clin Med 1995; 125: 303-4.
- Iraqi M y col. Immune thrombocytopenia: antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production in vitro. Haematologica 2015; 100(5): 623-32.
- Italiano JE y col. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. J Cell Biol 1999; 147: 1299-312.
- Italiano JE y col. Mechanics of proplatelet elaboration. J Thromb Haemost 2007; 5(Suppl. 1): 18-23.
- Italiano JE y Hartwig JH. Capíulo 2 en Platelets. In: Michelson AD, editor. 2013; 27-49.
- Ivanovs A y col. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. J Exp Med 2011; 208(12): 2417-27.
- Ji X y col. T cell immune abnormalities in immune thrombocytopenia. J Hematol Oncol 2014; 7: 72.
- Josefsson EC y col. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. J Exp Med 2011; 208: 2017-31.
- Junt T y col. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. Science 2007; 317(5845): 1767-70.
- Jurak Begonja A y col. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. Blood 2011; 118: 2285-95.
- Kanaji T y col. GPIba regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. Blood 2012; 119: 2906-13.
- Kaznelson P. Verschwinden der hämorrhagischen Diathese bei einem Falle von ‘‘essentieller Thrombopenie’’ (Frank) nach Milzexstirpation: splenogene thrombolytische Purpura. Wiener Klinische Wochenschrift 1916; 29: 1451-4.
- Kelley MJ y col. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. Nat Genet 2000; 26: 106-8.
- Kiefel V y col. Monoclonal antibody–specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 1987; 70: 1722-6.
- Kiel MJ y col. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell 2005; 121: 1109-21.
- Kile B. The role of the intrinsec apoptosis pathway in platelet life and death. J Thromb Haemost 2009; 7: 214-7.
- Kitchens CS y Pendergast JF. Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration. Blood 1986; 67: 203-6.
- Klinger MH y Jelkmann W. Subcellular localization of thrombopoietin in human blood platelets and its release upon thrombin stimulation. Br J Haematol 2001; 115: 421-7.
- Kondo M y col. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 1997; 91(5): 661-72.
- Kopp HG y col. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. Physiology 2005; 20: 349-56.

- Kowata S y col. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. Thromb Haemost 2014; 112(4): 743-56.
- Kunisaki Y y col. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. Nature 2013; 502(7473): 637-43.
- Kunishima S y col. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. Blood 2009; 113: 458-61.
- Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. Blood 2007; 109: 4607-16.
- Kuter DJ y col. Efficacy of Romiplostin in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double- blind randomised controlled trial. Lancet 2008; 371(9610): 395-403.
- Kuter DJ. Managing thrombocytopenia associated with cancer chemotherapy. Oncology 2015; 29(4): 282-94.
- Kuwana M y col. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. J Clin Invest 1998; 102: 1393-402.
- Kuwana M y col. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb- IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. Blood 2001; 98: 130-9.
- Larson MK y Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. Blood 2006; 108: 1509-14.
- Lecine P y col. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. Blood 1998; 92: 1608-16.
- Lecine P y col. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. Blood 2000; 96: 1366-73.
- Lev PR-Grodzielski M y col. Impaired proplatelet formation in immune thrombocytopenia: a novel mechanism contributing to decreased platelet count. Br J Haematol 2014; 165: 854-64.
- Leven RM. Megakaryocyte motility and platelet formation. Scanning Micros 1987; 1: 1701-9.
- Levin J. Murine megakaryocytopoiesis in vitro: an analysis of culture systems used for the study of megakaryocyte colonyforming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies. Blood 1983; 61: 617-23.
- Li HY y col. Elevated interleukin-27 enhances the polarization of Th1/Tc1 cells and the production of proinflammatory cytokines in primary immune thrombocytopenia. Hum Immunol 2012; 73: 240-7
- Li J y col. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and therapeutic target inimmune thrombocytopenia.Nat Commun 2015 Jul 17;6:7737.
- Li L y Xie T. Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol 2005; 21: 605-31.
- Li S y col. CD8+ T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocythopenic purpura. Br J Haematol 2007; 139: 605-11.
- Li X y col. Defective regulatory B cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. Blood 2012; 16: 3318-25.
- Li XM y col. High levels of acetylated low-density lipoprotein uptake and low tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 (Tie2) promoter activity distinguish sinusoids from other vessel types in murine bone marrow. Circulation 2009; 120(19): 1910-8.
- Lin H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. Nat Rev Genet 2002; 3: 931-40.
- Linden MD y Jackson DE. Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(11): 1762-6.
- Liu X y col. Decreased expression of interleukin-27 in immune thrombocytopenia. Br J Haematol 2011; 153: 259-67.
- Liu X y col. Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP. Blood 2016;128: 852-61.
- Lo Celso C y col . Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. Nature 2009; 457(7225): 92-6.
- Long M y col. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. Blood 1982; 59: 569-75.
- Long M y col. Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell. The burstforming unit—megakaryocyte. J Clin Invest 1985; 76: 431-8.

- Luc S col. Downregulation of Mpl marks the transition to lymphoidprimed multipotent progenitors with gradual loss of granulocyte-monocyte potential. Blood 2008; 111(7): 3424-34.
- Lugada ES y col. Population- based hematologic and immunologic references values for a healthy Ugandan population. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 29-34.
- Machlus KR y Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol 2013; 201(6): 785-96.
- Malara A y col. Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. Blood 2011; 118(16): 4449-53.
- Malara A y col. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. Stem Cells 2014; 32(4): 926-37.
- Malara A y col. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. Cell Mol Life Sci 2015; 10.1007/s00018-014-1813-y.
- Manz MG y col. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(18): 11872-7.
- Mauri C y Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol 2012; 30: 221-41.
- Mazharian A y col. Critical role of Src-Syk-PLCg2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis. Blood, 2010; 116: 793-800.
- Mazharian A y col. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. Blood 2011; 117: 5198-206.
- McDonald T y Sullivan P. Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. Exp Hematol 1993; 21: 1316-20.
- McKenzie CGJ y col. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP). Br J Haematol 2013; 163: 10-23.
- McMillan R y col. Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. JAMA 1978; 239: 2460-2.
- McMillan R y col. Plateletassociated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. Blood 1987; 70: 1040-5.
- McMillan R y col. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. Blood 2004; 103: 1364-9.
- McMillan R y col. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. Blood 2004; 103: 1364-9.
- McMillan R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 2007; 44: S3-S11.
- Medvinsky A y col. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development 2011; 138: 1017-31.
- Mendez-Ferrer S y col. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature 2010; 466(7308): 829-34.
- Menter DG y col. Platelets and cancer: a casual or causal relationship-revisited. Cancer Metastasis Rev 2014; 33(1): 231-69.
- Mitrevski M y col. Intravenous immunoglobulin and immunomodulation of Bcell – in vitro and in vivo effects. Front Immunol 2015; 6:4.
- Miyazaki H y col. Purification of rat megakaryocyte colony-forming cells using monoclonal antibody against rat platelet glycoprotein IIb/IIIa. Exp Hematol 1992; 20: 855-61.
- Miyazaki R y col. Comparative analyses of megakaryocytes derived from cord blood and bone marrow. Br J Haematol 2000; 108: 602-9.
- Molineux G y Newland A. Development of Romiplostin for the treatment of patients with chronic immune thromnocytopenia: from bench to bedside. Br J Haematol 2010; 150(1): 1-12.
- Morita Y y col. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. Exp Hematol 2011; 39: 351-59.
- Muguruma Y y col. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymalstem cells in the murine bone marrow compartment. Blood 2006; 107: 1878-87.

- Nagata Y y col. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. J Cell Biol 1997; 139: 449-57.
- Najaoui A y col. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). Eur J Haematol 2012; 88: 167-74.
- Nakeff A y Maat B. Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. Blood 1974; 43: 591-5.
- Nakeff A y Daniels-McQueen S. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colonyforming unit megakaryocyte (CFU-M). Proc Soc Exp Biol Med 1976; 151: 587-90.
- Nakorn TN y col. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(1): 205-10.
- Newland AC y col. High-dose intravenous IgG in adults with autoimmune thrombocytopenia. Lancet 1983; 1: 84-7.
- Newland AC y col. Intravenous IgG for autoimmune thrombocytopenia in pregnancy [letter]. N Engl J Med 1984; 310: 261-2.
- Neylon AJ y col.; Northern Region Haematology Group. Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. Br J Hematol 2003; 122: 966-74.
- Nieswandt B y col. Identification of antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenia in mice. Blood 2000; 96: 2520-7.
- Nilsson SK y col. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. J Histochem Cytochem 1998; 46(3): 371-7.
- Nilsson SK y col. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. Blood 2001; 97: 2293-9.
- Nishikii H y col. Unipotent megakaryopoietic pathway bridging hematopoietic stem cells and mature megakaryocytes. Stem Cells 2015; 33(7): 2196-207.
- Nishimoto T y Kuwana M. CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T cells in the Pathophysiology of Immune Thrombocytopenia. Semin Hematol 2013; 50(Suppl 1): S43-9.
- Niswander LM y col. SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. Blood 2014; 124: 277-86.
- Nomura S y col. Analysis of idiopathic thrombocytopenic purpura patients with antiglycoprotein Iib/IIIa or Ib autoantibodies. Acta Haematol 1991; 86: 25-30.
- Nurden P y col. Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease typ2B. Blood 2010; 115: 2649-56.
- Odell T y col. Generation cycle of rat megakaryocytes. Exp Cell Res 1968; 53: 321-328.
- Odell T y col. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. Blood 1970; 35: 775-82.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81: 2844-53.
- Olson TS y col. Megakaryocytes promote murine osteoblastic hsc niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. Blood 2013; 121: 5238-49.
- Olsson B y col. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Nat Med 2003; 9: 1123-4.
- Page LK y col. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. Br J Haematol 2007; 138(2): 245-8.
- Pallotta I y col. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. PLoS One 2009; 4(12): e8359.
- Patel SR y col. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. Blood 2005a; 106: 4076-85.
- Patel SR y col. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J Clin Invest 2005b; 115: 3348-54.
- Pease DC. An electron microscopic study of red bone marrow. Blood 1956; 11: 501-26.
- Pisciotta AV y col. Studies on platelets X. Morphologic characteristics of megakaryocytes by phase contrast microscopy in normals and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1953; 8: 703-23.

- Pitchford SC y col. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. Blood 2012; 120(14): 2787-95.
- Pittenger MF y col. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-7.
- Poirault-Chassac S y col. Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. PLoS ONE 2013; 8(5): e63810.
- Prandini MH y col. The tissue-specific transcriptional regulation of the megakaryocytic glycoprotein IIb gene is controlled by interactions between a repressor and positive cis-acting elements. Blood 1996; 88(6): 2062-70.
- Pronk CJ y col. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. Cell Stem Cell 2007; 1(4): 428-42.
- Provan D. Characteristics of immune thrombocytopenic purpura: a guide for clinical practice. Eur J Haematol Suppl 2009; 8-12.
- Provan D y col. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood 2010; 115: 168-86.
- Rabellino EM y col. Human megakaryocytes II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. J Exp Med 1981; 154: 88-100.
- Raslova H y col. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. Blood 2003; 101: 541-4.
- Reddi AH y col. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5589-92.
- Richardson JL y col. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. Blood 2005; 106: 4066-75.
- Rodeghiero F y col. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood 2009; 113(11): 2386-93.
- Rodeghiero F y col. Treatment practices in adults with chronic immune thrombocytopenia, a European perspective. Eur J Haematol 2010; 84: 160-8.
- Sabri S y col. Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. Blood 2004; 104: 3117-25.
- Sabri S y col. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. Blood 2006; 108: 134-40.
- Schachtner H y col. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. Blood 2013; 121: 2542-52.
- Schmitt A y col. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. Exp Hematol 2001; 29: 1295-302.
- Schoonen WM y col. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. Br J Haematol 2009; 145: 235-44.
- Schulze H y col. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. Blood 2006; 107: 3868-75.
- Schwab I y Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? Nat Rev Immunol 2013; 13(3): 176-89.
- Schwer HD y col. A lineage-restricted and divergent betatubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. Curr Biol 2001; 11: 579-86.
- Schwertz H y col. Anucleate platelets generate progeny. Blood 2010; 115: 3801-9.
- Scully M y col. Eltrombopag named patient programme for patients with chronic immune thrombocytopenia. Br J Haematol 2012; 157: 259-60.
- Semple JW y col. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 1991; 37: 258-62.
- Semple JW y Freedman J. Natural killer cell numbers and activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 1994; 83: 870-1.
- Semple JW y col. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. Blood 1996; 87: 4245-54.

- Semple JW y col. Platelets and the immune continuum. Nat Rev Immunol 2011; 11(4): 264-74.
- Semple JW. Bregging rights in ITP. Blood 2012; 120 (16): 3169.
- SempleI JW. The cellular pathophysiology of immune thrombocytopenia. SBT Science Series 2013; 8: 210-3.
- Senis YA y col. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. Blood 2014; 124(13): 2013-24.
- Seri M y col. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. Nat Genet 2000; 26: 103-5.
- Sharma V y col. Eltrombopag, an oral thrombopoietin agonist. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012; 16: 743-6.
- Shimomura T y col. Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1996; 95: 732-7.
- Shivdasani RA y col. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. Cell 1995; 81: 695-704.
- Shivdasani RA y col. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. EMBO J 1997; 16: 3965-73.
- Short B y col. Mesenchymal stem cells. Arch Med Res 2003; 34: 565-71.
- Shulman NR y col. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. Annals of the New York Academy of Sciences 1965; 124: 499-542.
- Smaniotto S y col. Mouse basophils reside in extracellular matrix-enriched bone marrow niches which control their motility. PLoS One 2013; 8(9): e70292.
- Smyth SS y col. Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. J Thromb Haemost 2009; 7(11): 1759-66.
- Sporn LA y col. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. Cell 1986; 46: 185-90.
- Spradling A y col. Stem cells find their niche. Nature 2001; 414: 98-104.
- Stahl CP y col. Incomplete antigenic cross-reactivity between platelets and megakaryocytes: relevance to ITP. Blood 1986; 67: 421-8.
- Stasi R y col. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia. PLos Med 2006; 3: e24.
- Stasi R y col. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2007; 110: 2924-30.
- Stasi R y col. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. Blood 2008a; 112: 1147-50.
- Stasi R y col. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. Thromb Haemost 2008b; 99: 4-13.
- Stasi R y col. Thrombopoietic agents. Blood Rev 2010; 24: 179-90.
- Stoll, D y col. Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia. Blood 1985; 65: 584-8.
- Strassel C y col. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. Haematologica 2009; 94: 800-10.
- Tablin F y col. Blood platelet formation in vitro: the role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. J Cell Sci 1990; 97(Pt 1): 59-70.
- Taichman RS y Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. J Exp Med 1994; 179: 1677-82.
- Taichman RS y col. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood 1996; 87: 518-24.
- Taichman RS y col. The hematopoietic microenvironment: osteoblasts and the hematopoietic microenvironment. Hematology 2000; 4: 421-6.
- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. Blood 2005; 105(7): 2631-9.

- Takahashi R y col. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. Blood 1999; 93: 1951-8.
- Therman E y col. Endomitosis: a reappraisal. Hum Genet 1983; 63: 13-8.
- Thon JN e Italiano JE. Platelet formation. Semin Hematol 2010; 47(3): 220-6.
- Thon JN y col. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. J. Cell Biol 2010; 191: 861-74.
- Thon JN y col. High-content live-cell imaging assay used to establish mechanism of trastuzumab emtansine (T-DM1)-mediated inhibition of platelet production. Blood 2012; 120: 1975-84.
- van Bladel ER y col. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. Blood 2014; 123: 1556-63.
- van Der Wal D y col. Desialylation: A novel platelet clearance mechanism and a poten-tial new therapeutic target in anti-gpIb antibody mediated thrombocytopenia. Blood 2012; 120: 265.
- van Leeuwen EF y col. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood 1982; 59: 23-6.
- Visnjic D y col. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. Blood 2004; 103: 3258-64.
- Vitrat N y col. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. Blood 1998; 91: 3711-23.
- Wang X y col. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. Stem Cells 2006; 24(3): 482-93.
- Ware J y col. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. J Clin Invest 1993; 92: 1213-20.
- Webster ML y col. Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIb-IIIa versus gpibalpha anti-bodies. Blood 2006; 108: 943-6.
- Werlhof PG. Disquisitio medica et philologica de variolis et anthracibus, signis differentiis, medelis disserit etc. Nicolai Foersteri 1735. Hannover.
- Williams N y col. Two-factor requirement for murine megakaryocyte colony formation. J Cell Physiol 1982; 110: 101-4.
- Williams N y Levine RF. The origin, development and regulation of megakaryocytes. Br J Haematol 1982; 52: 173-80.
- Woods VL Jr y col. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1984a; 64: 156-60.
- Woods VL Jr y col. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. Blood 1984b; 63: 368-75.
- Woolthuis P. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. Blood 2016; 127: 1242-8.
- Wright JH. The origin and nature of blood plates. Boston Medical and Surgical Journal 1906; 154: 643-5.
- Xiao D y col. Lung damage may induce thrombocytopenia. Platelets 2006; 17: 347-9.
- Yang L y col. Contributions of TRAIL mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. Blood 2010; 116: 4307-16.
- Yin T y Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Investig 2006; 116(5): 1195-201.
- Yoshida T y col. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. Nat Immunol 2006; 7(4): 382-91.
- Youssefian T y Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. Blood 2000; 95: 4004-7.
- Yu J y col. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood 2008; 112: 1325-8.
- Zhang J y col. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003; 425: 836-41.
- Zhang L y col. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. J Exp Med 2012; 209: 2165-81.
- Zhao Ch y col. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. Haematologica 2008; 93: 1428-30.
- Zou Z y col. Negative regulation of activated alpha-2 integrins during thrombopoiesis. Blood 2009; 113: 6428-39.