

ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio ultraestructural de las plaquetas de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna

Sara Vega,* Elba Reyes-Maldonado,* Jorge Vela-Ojeda,**
Moisés Xolotl-Castillo,** Laura Montiel-Cervantes,** Doris A. Cerecedo-Mercado***

* Depto. Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
** Servicio de Hematología, UMAE Hospital de Especialidades CMN "La Raza", IMSS.
*** Lab. Hematobiología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

***Ultrastructural study
of platelets patients with
paroxysmal nocturnal hemoglobinuria***

ABSTRACT

Introduction. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a hemolytic anemia characterized by intravascular hemolysis, cytopenias and venous thrombosis. Previous studies in patients with PNH have shown platelet abnormalities; however, their association with the clinical development of the sickness has not still been determined. **Material and methods.** In this study, we compared the morphology and distribution pattern of actin, myosin, tubulin and p-selectin in resting and activated platelets from 22 PNH patients and healthy donors by transmission electron microscopy and immunofluorescence. **Results.** The PNH platelet ultrastructure of resting and activated with different agonists (ADP, collagen and thrombin) showed morphological changes which suggested the presence of circulating platelets. The developed structures during the adhesion process (filopodia and lamellipodia formation), as well as the pattern distribution of actin, myosin, tubulin and p-selectin in PNH platelets were not modified in relation to control platelets. **Conclusion.** Morphological changes in resting platelets were related with p-selectin expression suggesting its determination as thrombosis indicator.

Key words. Platelets. Activation. PNH. Cytoskeleton. Thrombosis.

RESUMEN

Introducción. La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una anemia hemolítica caracterizada por hemólisis intravascular, citopenias y trombosis venosa. Estudios previos en pacientes con HPN han revelado anomalías plaquetarias; sin embargo, no se ha determinado su asociación con el desarrollo clínico de la enfermedad. **Material y métodos.** En el presente estudio se comparó la morfología y el patrón de distribución de actina, miosina, tubulina y P-selectina en plaquetas en reposo y activadas provenientes de 22 pacientes con HPN y de individuos sanos por microscopía electrónica de transmisión e inmunofluorescencia. **Resultados.** La ultraestructura de las plaquetas de individuos con HPN en reposo y activadas en suspensión con diferentes agonistas (ADP, colágeno y trombina) mostró cambios morfológicos que sugirieron la presencia de plaquetas activadas circulantes. Las estructuras desarrolladas durante el proceso de adhesión (formación de filopodios, lamelipodios), así como el patrón de distribución de actina, miosina, tubulina y P-selectina, no se modificaron en las plaquetas de los pacientes con HPN en relación con el testigo. **Conclusión.** Los cambios morfológicos en plaquetas en reposo fueron relacionados con la expresión de P-selectina, por lo que se sugiere su determinación como un parámetro indicativo de un posible riesgo trombótico.

Palabras clave. Plaquetas. Activación. HPN. Citoesqueleto. Trombosis.

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal de la célula tallo hematopoyética que genera células sanguíneas defectuosas. Esta alteración es secundaria a una mutación somática del gen *pig-A* (phosphatidylinositol glycan class A), que ocasiona cambios en la síntesis de la molécula.

Revista de Investigación Clínica / Vol. 58, Núm. 5 / Septiembre-Octubre, 2006 / pp 475-486

la de glucosilfosfatidilinositol (PIG), a la que estructuralmente se anclan proteínas reguladoras con actividad lítica del complemento (C).¹ La disminución de estas proteínas en la membrana de los eritrocitos las convierte en estructuras muy susceptibles a la lisis por la acción del C,^{2,3} por ello, esta enfermedad se considera como una anemia hemolítica adquirida caracterizada por hemólisis intravascular, citopenias y una alta incidencia de trombosis venosa.⁴

La magnitud de la hemólisis intravascular por C depende del grado de las deficiencias ya sea parcial o total de DAF (Decay Accelerating Factor, CD55), y MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis, CD59), que impide el ensamblaje de los complejos de la C3 convertasa (C4b2a y C3bBb) y (C5b-9), respectivamente.⁵ Se estima que en México la HPN tiene una incidencia de dos casos en 100,000 habitantes/año similar a lo reportado en Tailandia y China.⁶

La mayoría de los pacientes con HPN cursan con eventos trombóticos que constituyen la mayor causa de muerte.⁷ Sin embargo, la evaluación de los niveles y estados funcionales de las proteínas involucradas en la patogénesis de las trombosis venosas (proteína C, proteína S, y antitrombina), así como las mutaciones del factor V Leiden, no han revelado ninguna diferencia entre pacientes HPN e individuos sanos.^{8,9}

Las plaquetas son estructuras celulares anucleadas cuya función es la de formar un tapón hemostático sobre cualquier discontinuidad producida en el endotelio vascular. El citoesqueleto es un componente celular crítico para la regulación e integración de las funciones plaquetarias como el cambio de forma, adhesión, agregación, exocitosis y retracción, disparados cuando las plaquetas entran en contacto con substancias liberadas por el daño tisular. El citoesqueleto plaquetario está formado por una red de filamentos de actina,^{10,11} de un anillo marginal de microtúbulos,¹² moléculas de miosina¹³ y proteínas de unión a actina tales como α -actinina, vinculina, talina, espectrina y tropomiosina.¹⁴⁻¹⁶ La actina determina el cambio de la forma discoide, involucrando la formación de filopodios y lamelipodios,¹⁷ mientras que el anillo de microtúbulos se modifica fragmentándose o disminuyendo su diámetro.^{18,19} La miosina se asocia con filamentos de actina para formar un gel de actomiosina, responsable de la centralización de los organelos en una zona conocida como granulómero; mientras que su asociación con α -actinina genera la fuerza tensorial necesaria para la adhesión y la retracción plaquetaria.²⁰

En los pacientes con HPN, la regulación anormal del C puede desencadenar los procesos de activación

plaquetaria,^{21,22} ya que la fracción C5b-9 produce la formación de vesículas plaquetarias y la generación de trombina.²³ Asimismo, se ha descrito que las plaquetas de los pacientes con HPN muestran un incremento en la expresión de marcadores de activación²⁴ probablemente por su continua exposición al ADP proveniente de la lisis de eritrocitos.²⁵ Sin embargo, los estudios relacionados con la fisiología de las plaquetas de estos pacientes no han correlacionado con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En virtud de que durante la función plaquetaria se involucran cambios estructurales, el estudio de éstos en las plaquetas HPN podría contribuir a explicar el desarrollo de los procesos trombóticos en estos pacientes. En el presente estudio se caracterizó la ultraestructura de plaquetas de pacientes con HPN en presencia y ausencia de activadores plaquetarios; la distribución de los principales componentes del citoesqueleto y gránulos citoplásmicos por inmunofluorescencia mientras que por citometría de flujo se evaluó la expresión de P-selectina. Los resultados obtenidos no mostraron cambios en la redistribución del citoesqueleto y gránulos citoplásmicos en plaquetas de pacientes con HPN en reposo ni durante el proceso de adhesión a sustrato en relación con los controles. Sin embargo, se encontraron diferencias en la respuesta ante diversos agonistas, los cuales no guardaron relación con los parámetros de laboratorio indicativos de hemólisis activa. Se sugiere que la determinación de P-selectina en las plaquetas de los pacientes con HPN podría ser un indicador de riesgo de trombosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron 22 pacientes adscritos al área de Hematología del Hospital de Especialidades del CMN "La Raza" con diagnóstico de HPN. Éste fue determinado mediante las pruebas de Ham, sacarosa e inulina y confirmado por la evaluación de algunos marcadores de superficie (CD55, CD59) por citometría de flujo. Asimismo, se incluyeron 10 individuos sanos como control, quienes aceptaron participar en el estudio y cuyas muestras se procesaron en forma paralela a las de los pacientes.

Estudios de laboratorio

A su ingreso al estudio, tanto a los pacientes de HPN como a los testigos incluidos en el presente estudio se les realizaron biometría hemática completa

(Cell-Dyn) y LDH (deshidrogenasa láctica) método automatizado (Abbot Diagnostics).

Obtención de plaquetas en suspensión

Bajo consentimiento previo se obtuvieron plaquetas a partir de sangre periférica por punción venosa de pacientes con HPN y de individuos sanos. La sangre se mezcló inmediatamente con anticoagulante de citratos contenido dextrosa a pH 6.5 (93 mM de citrato de sodio, 70 mM de ácido cítrico y 140 mM de dextrosa), en una proporción de nueve partes de sangre y una de anticoagulante. Las plaquetas se separaron de la sangre total por centrifugación a 100 g por 10 minutos a temperatura ambiente, el plasma rico en plaquetas se combinó con un volumen igual de anticoagulante citratado y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El paquete plaquetario se resuspendió y se lavó con solución Tyrode (ácido cítrico 36 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 103 mM, glucosa 5 mM) dos veces, se mantuvieron a 37 °C durante 60 minutos, con el fin de que las plaquetas activadas por los lavados regresaran a un estado de reposo.

Activación de las plaquetas en suspensión

La suspensión de plaquetas se incubó con los agonistas ADP, colágeno o trombina a una concentración final de 10 µM, 2 µg/mL y 1.0 U/mL, respectivamente, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron por la adición de un volumen igual de glutaraldehído al 5% en Tyrode durante 60 minutos a temperatura ambiente y se procesaron para microscopía electrónica de transmisión (MET).

Procesamiento de plaquetas para corte fino y MET

Las plaquetas tanto en reposo como activadas en suspensión y previamente fijadas con glutaraldehído, se lavaron dos veces con Tyrode, se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% a 4 °C en el mismo regulador por 30 minutos y se tiñeron toda la noche con acetato de uranilo acuoso al 2%. Los paquetes celulares se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en resina SPURR. Se obtuvieron cortes finos y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observaron y fotomicrografiaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 a 70 kV.

Adhesión plaquetaria y fijación

Las plaquetas se sedimentaron sobre cubreobjetos de vidrio durante 20 minutos. Posteriormente, se eliminaron aquellas no adheridas mediante dos lavados con PBS. Las plaquetas adheridas se fijaron y permeabilizaron con una mezcla de 2% p-formaldehído, 0.05% de glutaraldehído y 0.04% de NP40 en la solución estabilizante del citoesqueleto, PHEM (100 mM PIPES, 5.25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 20 mM MgCl₂) por 20 minutos.

Inmunofluorescencia

Las plaquetas en reposo y las adheridas, fijadas y permeabilizadas fueron incubadas con 0.1 mg/mL de faloidina FITC para teñir filamentos de actina (Sigma Chemical Co, St. Louis MO), así como con los anticuerpos dirigidos contra miosina (Cat sc-6956, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California) desarrollado en ratón, beta-tubulina (Cat sc-9104, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California) desarrollado en conejo y P-selectina (Cat sc-6941, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California) desarrollado en cabra, diluidos en PBS conteniendo albúmina bovina al 0.1%. Después de dos horas, la reacción fue revelada con el anticuerpo secundario correspondiente. Los cubreobjetos se montaron en Vectashield para su observación en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX41 utilizando un objetivo UPlanFI 100X con apertura numérica de 1.30. Se evaluaron al menos 20 campos por cada laminilla.

Determinación de P-selectina por citometría de flujo

A una concentración de 500 plaquetas/mm³ en reposo y activadas con ADP (10 mmol) provenientes de individuos sanos y a una concentración similar de plaquetas en reposo de pacientes con HPN se adicionaron 10 µL del anticuerpo dirigido contra CD62P (Dako North America, Inc, Carpintería, CA), marcado con isiotiocianato de fluoresceína, se mezcló e incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se adicionaron 500 µL de solución PBS/EDTA 9 mmol (solución salina de fosfatos/ácido etilendiaminotetraacético). Posteriormente se procedió a la adquisición y análisis de datos de las muestras en un citómetro de flujo FACS calibur (Becton Dickinson, San José, CA) que cuenta con el programa CellQuest (versión 3.2.2 Apple System 7.6.1).

Análisis estadístico

De acuerdo con los hallazgos morfológicos derivados de las observaciones realizadas por microscopia electrónica, los 22 pacientes incluidos en el estudio fueron agrupados en dos categorías. Los parámetros sanguíneos registrados para cada grupo de pacientes fueron evaluados estadísticamente para determinar la existencia de diferencias significativas empleando la prueba t-Student (concentración de plaquetas y LDH), así como la prueba U de Mann-Whitney (porcentaje de reticulocitos y P-selectina). Se determinó el valor de p con 95% de confianza, empleando el programa Sigma Stat 2.03.

RESULTADOS

Características clínicas y datos de laboratorio

En el cuadro 1 se muestra la distribución de los pacientes de acuerdo con su edad y sexo. De los 22 pacientes estudiados nueve correspondieron al sexo femenino y 13 al sexo masculino, cuyas edades fluctuaron entre 24 y 74 años. La mayor incidencia de la enfermedad (10 pacientes) se presentó en la cuarta década de la vida de los cuales tres correspondieron a individuos del sexo femenino y siete al sexo masculino; seguida de cinco pacientes (dos del sexo femenino y tres del sexo masculino) entre los 41 y 50 años de edad. También se incluyeron en el estudio tres pacientes (dos mujeres y un hombre) en la tercera década de la vida, así como otros dos pacientes (hombres) cuyas edades fluctuaron entre los 51 a 60 años de edad. En la séptima y octava década de la vida, quedó incluida una paciente, respectivamente.

La historia clínica de los pacientes incluidos en el presente estudio reveló que la manifestación clínica por la que acudieron para su atención médica

Cuadro 1. Distribución de los pacientes con HPN de acuerdo con la edad y el sexo.

Intervalo de edad (años)	Mujeres	Hombres	Total	%
21-30	2	1	3	13.6
31-40	3	7	10	45.4
41-50	2	3	5	22.7
51-60	-	2	2	9.1
61-70	1	-	1	4.6
71-80	1	-	1	4.6
Total	9	13	22	100

Cuadro 2. Distribución de los pacientes con HPN de acuerdo con la manifestación clínica inicial.

Manifestación clínica	Asociación	No. de casos
Síndrome anémico	Exclusivamente	6
	Orinas oscuras	6
	Cefalea	3
	Hemorragia	3
	Pancitopenia	2
	Cefalea y dolor abdominal	2
Total		22

Cuadro 3. Distribución de los pacientes de acuerdo con algunos parámetros sanguíneos.

Parámetro	Valor límite	No. de casos
Hemoglobina (g/dL)	Mujeres < 12.0	7
	> 12.0	3
CN = 12.2-18.1	Hombres < 13.6	6
	> 13.6	6
Reticulocitos (%)	> 3	18
	< 3	4
Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	< 4.5	12
	> 4.5	10
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	< 150	6
	> 150	16
LDH (U/L)	> 460	18
	< 460	4

ca, correspondió al síndrome anémico en los 22 casos e incluso pancitopenia. Asimismo, se determinó la presencia de otros síntomas asociados como orinas oscuras, cefalea, hemorragia (epistaxis y metrorragias), dolor de cabeza y dolor abdominal; mientras que la biometría hemática practicada a todos los pacientes a su ingreso presentó pancitopenia en dos de ellos (Cuadro 2).

Cabe señalar que el análisis de los expedientes clínicos mostró que algunos pacientes del sexo masculino por cuestiones laborales estuvieron expuestos a agentes químicos como solventes, pesticidas y materiales de construcción; mientras que sólo una paciente fue diagnosticada después del parto. Sin embargo, en la mayoría de los casos no fue posible determinar algún antecedente que pudiera estar relacionado con la aparición de la enfermedad.

El diagnóstico de HPN fue confirmado mediante la cuantificación de CD55 y CD59 por citometría de flujo (datos no mostrados). A cada paciente le fue practicada una biometría hemática con la cual se evaluó la concentración de hemoglobina, número de

eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como el porcentaje de reticulocitos. Adicionalmente, se identificó la presencia de eventos hemolíticos mediante la cuantificación de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH). En el cuadro 3 se encuentran registrados los parámetros antes mencionados utilizados para el diagnóstico de HPN obtenidos en el momento de la realización de este estudio; asimismo, se indica el número de pacientes cuyos valores están por debajo de los límites considerados como normales.

De los 22 pacientes estudiados, siete del sexo femenino presentaron valores de hemoglobina menores a 12 g/dL, mientras que para seis del sexo masculino, la concentración de hemoglobina fue menor de 13.6 g/dL. El porcentaje de reticulocitos fue ma-

yor de 3% en 18 de los casos, lo cual reflejó una regeneración activa de los eritrocitos. Los leucocitos se encontraron disminuidos por debajo de $4.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ en 12 de los pacientes mientras que la concentración de las plaquetas circulantes menor a $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ se encontró sólo en seis pacientes. Dieciocho pacientes presentaron lisis activa reflejada en una concentración mayor de 460 U/L de LDH.

Distribución topográfica de los filamentos de actina, moléculas de miosina y tubulina en plaquetas en reposo y adheridas a vidrio

Con el fin de determinar si las plaquetas provenientes de los pacientes con HPN presentaban cam-

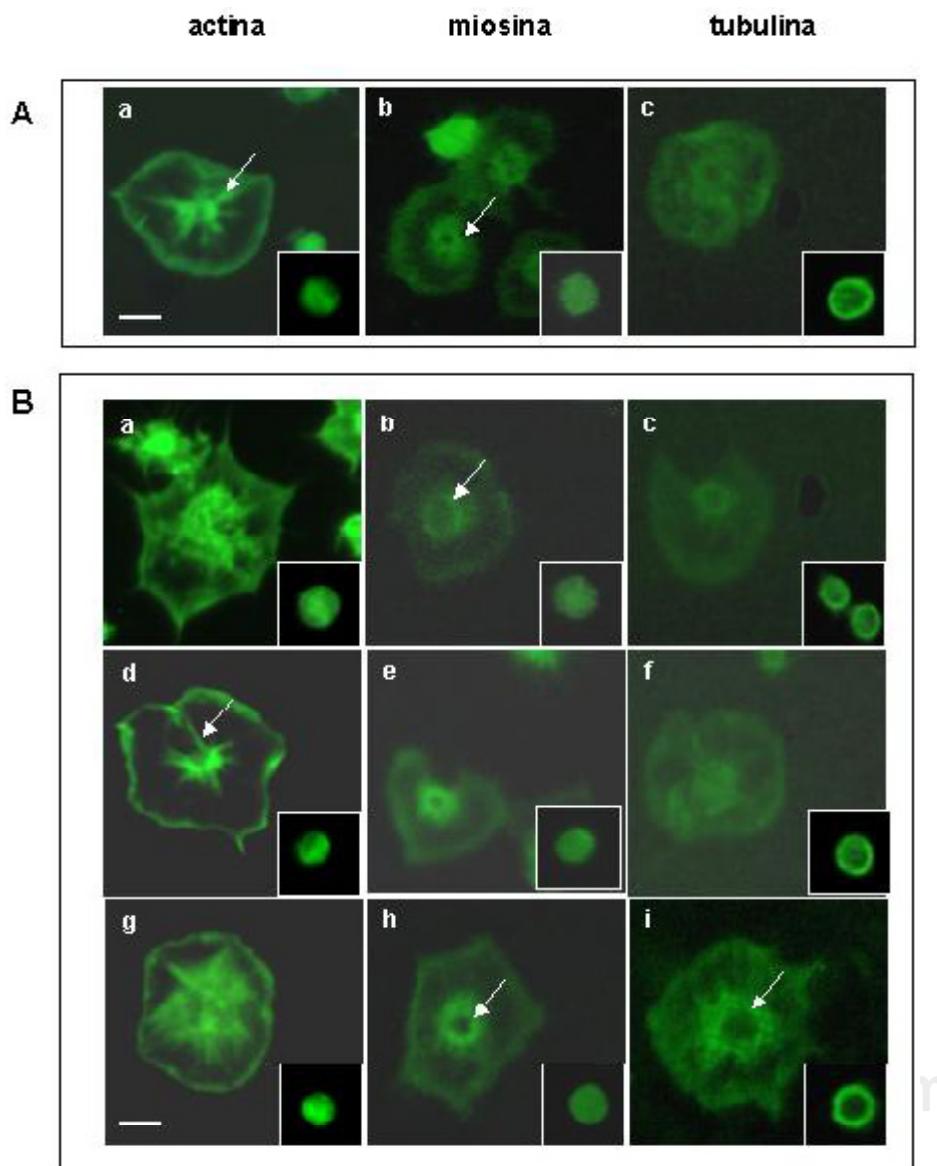


Figura 1. Distribución topográfica de filamentos de actina, moléculas de miosina y tubulina en plaquetas en reposo y adheridas.

Panel A. Las plaquetas de individuos sanos en reposo (insertos) y adheridas fueron procesadas para técnicas de inmunofluorescencia para marcar filamentos de actina (a), moléculas de miosina (b) y moléculas de tubulina (c).

Panel B. Las plaquetas de pacientes con HPN en reposo (insertos) y adheridas fueron procesadas para técnicas de inmunofluorescencia para marcar filamentos de actina (a, d, g), moléculas de miosina (b, e, h) y moléculas de tubulina (c, f, i). Las flechas en Aa y Bd señalan los filamentos de actina organizados en haces radiales. En Bb y Bi señalan las moléculas de miosina y tubulina respectivamente rodeando el granulómero. Escala = 5 μm .

bios en la distribución de los diferentes elementos del citoesqueleto, se procesaron plaquetas en reposo y adheridas a vidrio para ser observadas por microscopía de fluorescencia. Los resultados fueron comparados con muestras provenientes de individuos sanos procesadas simultáneamente.

Las plaquetas de individuos sanos, en reposo, mostraron filamentos de actina localizados en un core central, así como alrededor de la membrana citoplasmática (Figura 1A a, inserto). Las moléculas de miosina presentaron una distribución citoplásrica homogénea (Figura 1A b, inserto), mientras que las moléculas de tubulina se encontraron constituyendo un anillo marginal delimitando la forma de la plaqueta (Figura 1A c, inserto).

En las plaquetas adheridas a vidrio obtenidas a partir de los 10 donadores sanos, se observó la presencia de filamentos de actina organizados en haces radiales que se formaron a partir de la zona del granulómero (Figura 1a, flecha); asimismo, los bordes de la membrana se observaron decorados con filamentos de actina, los cuales son poco evidentes en la zona del citoplasma (Figura 1A a). Las moléculas de miosina se encontraron constituyendo el anillo contráctil que rodea la zona del granulómero (Figura 1A b, flecha), así como alrededor de la membrana plasmática. Adicionalmente, el anillo marginal de microtúbulos se disoció para permitir la extensión de la plaqueta, y las moléculas de tubulina fueron redistribuidas permaneciendo alrededor del granulómero (Figura 1A c, flecha) y de la membrana plasmática.

Las plaquetas en reposo provenientes de los 22 pacientes con HPN (Figura 1B a-c insertos), mostraron una distribución de filamentos de actina, miosina y tubulina similar a la de las provenientes de individuos sanos. Los filamentos de actina permanecieron en el citoplasma a manera de conglomerados citoplásicos (Figura 1B a,d,g, insertos), mientras que las moléculas de miosina conservaron su distribución homogénea en la zona del citoplasma (Figura 1B b,e,h, insertos), así como el anillo marginal de microtúbulos (Figura 1B c,f,i, insertos).

Las plaquetas HPN adheridas a vidrio, presentaron filamentos de actina en la zona del granulómero con haces radiales dirigidos hacia el citoplasma y en la zona de avance del lamelipodio (Figura 1B d, flecha); mientras que las moléculas de miosina (Figura 1B h) y de tubulina (Figura 1B i) se observaron rodeando al granulómero (flechas) y a la membrana citoplasmática.

En general, las imágenes de inmunofluorescencia de las plaquetas de los pacientes con HPN con las que se determinó la distribución de los elementos del

citoesqueleto (actina, miosina y tubulina), no revelaron diferencias en relación con las plaquetas de los individuos sanos tanto en estado de reposo como adheridas a vidrio.

Relación del grado de activación y función plaquetaria

Dentro de los cambios incluidos en el proceso de activación, se encuentran la centralización de los gránulos citoplásicos con la consecuente liberación de su contenido hacia el sistema canalicular abierto. Se ha considerado que durante estos eventos, los gránulos también pueden migrar hacia la membrana citoplasmática para liberar su contenido por exocitosis.²⁶ La secreción de algunos de los componentes de los gránulos pueden expresarse en las membranas de las plaquetas (citoplasmática y sistema canalicular abierto), como ocurre con la P-selectina.

Para evaluar el grado de activación de las plaquetas de los 22 pacientes con HPN, se determinó la expresión de P-selectina (CD62P) como un marcador de la activación plaquetaria, así como la distribución de los gránulos citoplásicos en comparación con las plaquetas de los 10 individuos sanos.

La P-selectina se observó como un componente de los gránulos citoplásicos, por lo que la marca se localizó en el centro de las plaquetas en reposo tanto de individuos sanos (Figura 2A a inserto) como de pacientes con HPN (Figura 2B a-f insertos). Sin embargo, durante la adhesión los gránulos fueron redistribuidos pudiéndose localizar tanto en el granulómero (Figura 2A a,c, flechas), como dispersos en el citoplasma de las plaquetas sanas. La P-selectina también pudo observarse delimitando la zona de la membrana citoplasmática.

Las plaquetas de pacientes con HPN presentaron una distribución de este marcador similar a la descrita para las plaquetas sanas. La Figura 2B muestra la localización de la P-selectina en las plaquetas que mantuvieron los gránulos centralizados en el área del granulómero, así como en el citoplasma. También pudieron observarse plaquetas con los gránulos ubicados en la zona de la membrana citoplasmática (no mostrados). Los diferentes patrones de distribución de los gránulos citoplásicos observados en las plaquetas control, no se ven modificadas en relación con los observados en las plaquetas en estudio. Asimismo, la intensidad y distribución de la fluorescencia observada en ambos tipos de muestras es similar, por lo que esta metodología no permitió discriminar el grado de activación entre las plaquetas sanas y con HPN.

Ultraestructura de plaquetas de pacientes con HPN

Con el fin de caracterizar la ultraestructura de las plaquetas en reposo y activadas en suspensión con diferentes agonistas (ADP, colágena y trombina), las plaquetas provenientes de pacientes con HPN se procesaron para su análisis por microscopía electrónica de transmisión. Las plaquetas provenientes de individuos sanos fueron tratadas y procesadas simultáneamente como control.

Los agonistas empleados en el presente estudio (ADP, colágena y trombina) se caracterizan por disparar diferentes rutas de señalización, por lo que los cambios morfológicos generados, disparados por ellos también lo son. Estas diferencias son estadísticamente significativas, lo que permite discriminar la acción de cada uno de los agonistas antes mencionados.²⁷

Las plaquetas en reposo de los pacientes y las de los individuos testigo fueron procesadas en presencia de glutaraldehído para disminuir al máximo la activación plaquetaria provocada por los procesos de obtención y purificación (centrifugación); sin embargo, aproximadamente 80% de las plaquetas observadas mostraron una morfología discoide típica con gránulos dispersos en el citoplasma (Figura 3A a), mientras

que el restante 20% presentó algunos signos indicativos de una ligera activación como lo son la extensión de filopodios cortos (Figura 4A a, flecha).

La activación con ADP genera la formación de filopodios largos y delgados, así como una amplificación moderada del sistema canalicular abierto (Figura 4A b). Los cambios morfológicos producidos por la activación con colágena generaron la formación de filopodios cortos y anchos, y una amplificación del sistema canalicular abierto (SCA) en ocasiones imperceptible (Figura 4A c). La activación con trombina indujo los cambios morfológicos más drásticos de los tres agonistas empleados, estos cambios incluyen la formación de numerosos filopodios, que además tienen la característica de ser delgados y largos; el SCA se observó amplificado dando al citoplasma de las células el aspecto de tener numerosas vacuolas (Figura 4A d).

De acuerdo con las observaciones hechas a partir de las imágenes de plaquetas de HPN obtenidas por MET, se clasificaron a los pacientes en dos grupos: Un primer grupo de 14 pacientes cuyas plaquetas presentaron una morfología tanto en condiciones de reposo como activadas con los agonistas, similar a la observada en las plaquetas provenientes de los 10 individuos sanos (Figura 4B a-l). El segundo grupo

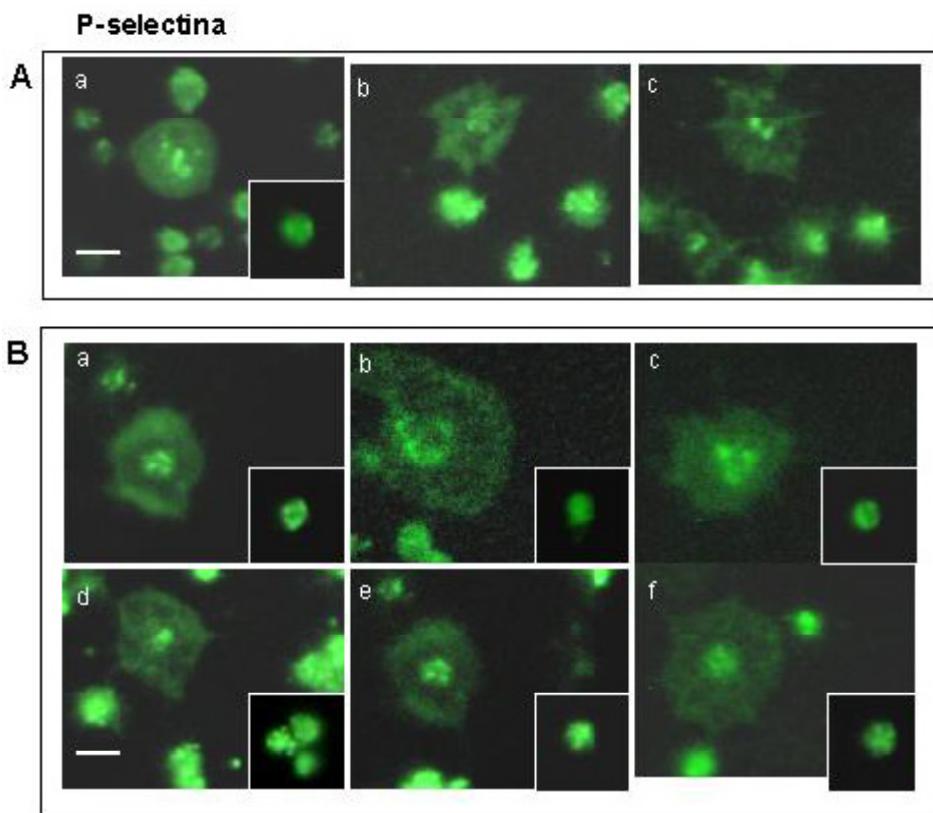


Figura 2. Expresión de P-selectina en plaquetas en reposo y adheridas. Plaquetas control (panel A) y de HPN (panel B) fueron procesadas en reposo (insertos) y en adhesión para inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo dirigido contra P-selectina y revelado con un anticuerpo secundario marcado con FITC. Escala = 5 μm.

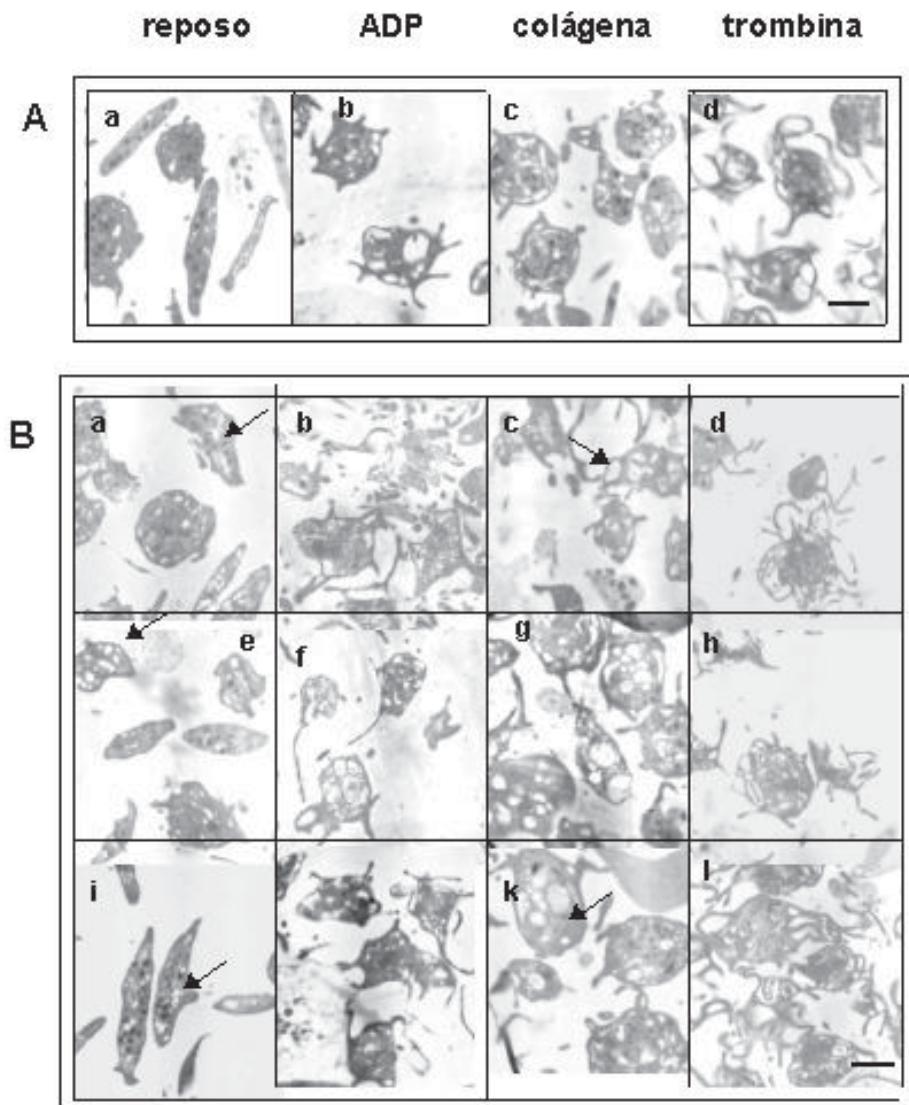


Figura 3. Ultraestructura de plaquetas en reposo y activadas con ADP, colágena y trombina.

Panel A. Micrografías de plaquetas provenientes de individuos sanos. Plaquetas en reposo (a) y activadas con ADP (b), colágena (c) y trombina (d) fueron procesadas para MET.

Panel B. Micrografías de plaquetas provenientes de diferentes pacientes con HPN. Plaquetas en reposo (a, e, i) activadas con ADP (b, f, j), colágena (c, g, k) y trombina (d, h, l). Las imágenes son representativas de las observadas a partir de ocho pacientes incluidos en el grupo 2. Las flechas en B a, e, i señalan la amplificación del SCA en plaquetas con aparente forma discoide. En Bc y Bk señalan la pérdida de redondeo y la amplificación del SCA, respectivamente, en las plaquetas de pacientes con HPN activadas con colágena. Escala = 1 μ m.

incluyó a las plaquetas de ocho pacientes cuyos cambios morfológicos observados por efecto de los agonistas fueron más evidentes y más drásticos (Figura 3B a-l).

Grupo 1

Las plaquetas en reposo de pacientes con HPN del grupo 1 tratadas con glutaraldehído al 0.05%, mostraron mayores indicios de activación que las plaquetas testigo, como fueron la pérdida de la forma discoide, desarrollo de extensiones cortas de la membrana y una ligera amplificación del sistema canicular abierto, e incluso se observó la presencia de microvesículas procoagulantes (Figura 4B a, flecha).

Las plaquetas tomadas de pacientes con HPN y activadas con los diferentes agonistas, presentaron

diversos grados de activación observándose imágenes muy similares a las de las plaquetas consideradas como testigo.

La activación de las plaquetas de HPN con ADP 10 μ M produjo la formación de esferas compactas, formación de dos a tres filopodios largos y angostos, amplificación del SCA y la dispersión de los gránulos citoplásmicos a la periferia de la membrana (Figura 4B b, f, j, flecha en f).

La activación plaquetaria con colágena 2 μ M generó redondeo de las estructuras discoideas, con la formación de dos a tres filopodios cortos y gruesos, amplificación del SCA y dispersión de los gránulos citoplásmicos. Algunas plaquetas conservaron la forma discoide o permanecieron redondeadas sin la extensión de filopodios (Figura 4B g flecha).

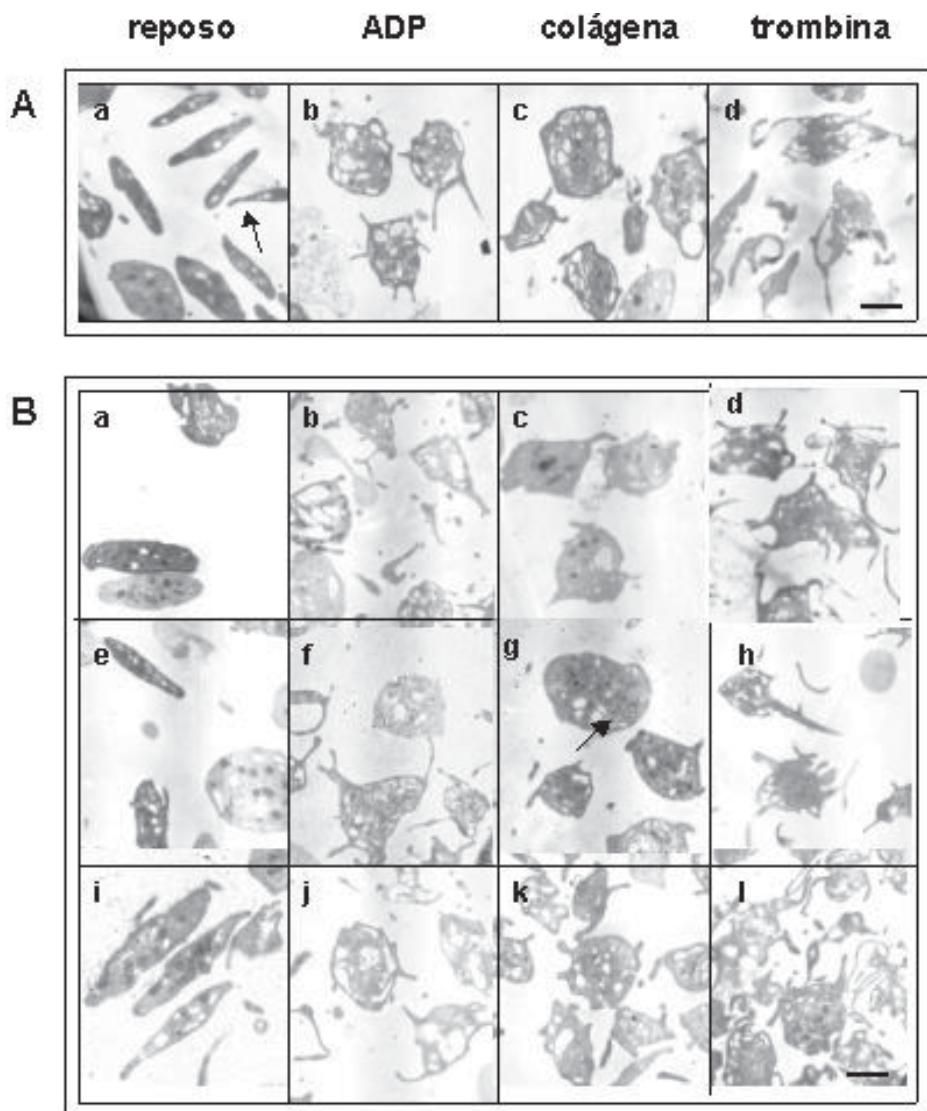


Figura 4. Ultraestructura de plaquetas en reposo y activadas con ADP, colágena y trombina.

Panel A. Micrografías de plaquetas provenientes de individuos sanos. Plaquetas en reposo (a) y activadas con ADP (b), colágena (c) y trombina (d) fueron procesadas para MET.

Panel B. Micrografías de plaquetas provenientes de diferentes pacientes con HPN. Plaquetas en reposo (a, e, i), activadas con ADP (b, f, j), colágena (c, g, k) y trombina (d, h, l). Las imágenes son representativas de las observadas a partir de los 14 pacientes incluidos en el grupo 1. La flecha en Aa señala un filopodio corto como signo indicativo de una ligera activación. En Bg señala una plaqueta activada con colágena sin la extensión de filopodios. Escala = 1 μ m.

La activación con trombina 1 U/mL al igual que con las plaquetas control, produjo los cambios más drásticos en las plaquetas de HPN, observándose la formación de múltiples filopodios heterogéneos en forma y tamaño, que deformaron el cuerpo de la plaqueta. La amplificación del SCA le dio al citoplasma la apariencia de estar vacuolado, mientras que los gránulos se encontraron dispersos (Figura 3B d,h,l).

Grupo 2

Una proporción importante de las plaquetas en reposo de HPN del grupo 2, aun cuando fueron tratadas con glutaraldehído al 0.05% al igual que a las plaquetas testigo, presentaron importantes cambios estructurales como resultado de la activación, como la pérdida de la forma discoide y la formación de filopodios cortos. Es importante hacer notar que la am-

plificación del SCA fue evidente incluso en aquellas plaquetas con aparente forma discoide (Figura 3B a, e, i flechas).

El tratamiento de plaquetas de HPN con ADP generó cambios morfológicos profundos y más drásticos que los observados para las muestras testigo. Fue muy característica la presencia de estructuras sin forma definida con numerosos filopodios heterogéneos en forma y tamaño; la formación de estructuras esféricas se observó en baja proporción. Adicionalmente, fue muy evidente la amplificación del SCA, que en muchas ocasiones ocupó gran parte del citoplasma (Figura 3B b, f, j).

La comparación de las imágenes obtenidas a partir de las plaquetas de HPN activadas con colágena y las plaquetas testigo tratadas bajo estas mismas condiciones, reveló cambios morfológicos sutiles so-

bre todo en el redondeo de las estructuras y en la amplificación del SCA (Figura 3B c, g, k flecha). Mientras que los cambios más drásticos se observaron durante la activación con trombina, ya que tanto las plaquetas de HPN como las testigo, tratadas con este agonista presentaron cambios morfológicos similares a los ya descritos anteriormente y que incluyeron la formación de numerosos filopodios largos con pérdida de la forma esférica, la amplificación del SCA y la dispersión de los gránulos en todo el citoplasma (Figura 3B d, h, l).

Condiciones que favorecen la activación de las plaquetas de los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna

En el cuadro 4 se muestran los valores de reticulocitos (%) y de deshidrogenada láctica (U/L) encontrados en los dos grupos en que se dividieron a los pacientes. Los valores elevados de ambos parámetros son indicativos de una hemólisis activa, los cuales fueron evaluados estadísticamente.

Cuadro 4. Resultados de laboratorio de los pacientes de los grupos 1 y 2.

Parámetro	Valores de referencia	Grupo 1	Grupo 2	Valor de p
Reticulocitos (%)	1-3%	8.7	3.5	0.101
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	150-450	179.5	173.5	0.946
LDH (U/L)	230-460	3441.6	1224.5	0.014

Cuadro 5. Valores de P-selectina de las plaquetas en reposo de los pacientes de los grupos 1 y 2 y su comparación estadística con las plaquetas control en reposo y activado.

P-selectina (%)	Media ± DS	Comparación de valores de P-selectina entre grupos	Valor de p
Pq. reposo Media ± DS	7.27 ± 0.7	C. reposo y C. activado	< 0.001
Pq. activadas Media ± DS	38.5 ± 9.54	Grupo 1 (reposo) y C. activado	< 0.001
Pq. grupo1 (reposo) Media ± DS	15.6 ± 0.65	Grupo 2 (reposo) y C. activado	0.075
Pq. grupo 2 (reposo) Media ± DS	28.1 ± 5	Grupo 1 (reposo) y Grupo 2 (reposo)	< 0.001

En el grupo 1, en el que se ubicó a 14 pacientes, el porcentaje de reticulocitos y plaquetas presentó una mediana de 8.7 y 179.5, respectivamente, mientras que las correspondientes a los pacientes del grupo 2 para reticulocitos fueron de 3.5 y 173.5 para plaquetas, cabe señalar que ninguno de estos parámetros fue estadísticamente significativo. La media de la concentración de LDH para los pacientes del grupo 1 fue de 3,441.6 y 1,224.5 U/L para el grupo 2; el análisis estadístico reflejó significancia con un valor de P de 0.014 (Cuadro 4).

Para evaluar la posible preactivación de las plaquetas circulantes provenientes se cuantificó la expresión de P-selectina en plaquetas en reposo en ambos grupos de pacientes; los resultados se compararon con los obtenidos a partir de plaquetas en reposo y activadas de individuos sanos (n = 10). En el cuadro 5 se muestran los valores de P-selectina para las plaquetas de individuos sanos en reposo y activadas (7.27 y 38.5, respectivamente), mientras que para las del Grupo 1 correspondió a 15.6 y 28.1 para el grupo 2. La evaluación estadística de los valores de P-selectina antes mencionados mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las plaquetas control (reposo y activadas), entre las del grupo 1 y el control activado, así como entre el grupo 1 y grupo 2 (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

La trombosis es la complicación más importante que compromete la vida del paciente con HPN.⁷ Los estudios encaminados a determinar la causa que desencadena esta complicación incluyen el aumento de la concentración del activador del plasminógeno, así como la presencia de micropartículas procoagulantes²⁵ y la circulación de plaquetas activadas;^{23,24} sin

embargo, los cambios morfológicos y metabólicos disparados durante los procesos de activación en plaquetas de pacientes con HPN no han sido determinados.

El análisis ultraestructural realizado en el presente estudio mostró que algunos pacientes con HPN tenían plaquetas circulantes que fueron más sensibles a la activación con agonistas (ADP, colágena y trombina). No obstante que la distribución de actina, miosina, tubulina y gránulos citoplásmicos no fueron modificadas; las diferencias ultraestructurales correlacionaron con los altos niveles de expresión de P-selectina determinada por citometría de flujo en comparación con plaquetas en reposo y activadas provenientes de individuos sanos.

Se sabe que proteínas del citoesqueleto como la actina, la miosina y la tubulina se reorganizan durante los procesos de activación,^{28,29} participando activamente en los procesos de contracción y adhesión a substrato vía integrina $\beta 1$.¹¹ Sin embargo, las plaquetas de los pacientes con HPN no mostraron una deslocalización de los elementos del citoesqueleto ensayados, ni influyeron en la capacidad de adhesión a sustrato. Esto sugiere que la disminución de proteínas de anclaje en la membrana de plaquetas de pacientes con HPN no afectó la capacidad de adhesión de éstas.

La ultraestructura de las plaquetas de individuos sanos activadas con diferentes agonistas, ya ha sido caracterizada previamente estableciéndose diferencias significativas en el número y dimensiones de los filopodios.²⁷ Las observaciones hechas por microscopía electrónica de las plaquetas de HPN activadas con diferentes agonistas (ADP, colágena y trombina) permitieron clasificar a los pacientes estudiados en dos grupos (grupo 1 y grupo 2, Figuras 3 y 4). La morfología de las plaquetas del grupo 1 fue similar a la de los testigos, mientras que la del grupo 2 correlacionó con estudios previos en los que se ha observado un aumento en la sensibilidad a la agregación plaquetaria inducida por trombina, sugiriendo que las plaquetas de los pacientes con HPN se encontraron hiperactivas.³⁰ La ultraestructura observada en las plaquetas de HPN pertenecientes al grupo 2, sugirió estados de preactivación, que fueron corroborados mediante la determinación de P-selectina por citometría de flujo en estado de reposo, no obstante que los pacientes del grupo 1 pudieron haber presentado una mayor activación plaquetaria por cursar con episodios hemolíticos más pronunciados (Cuadro 4). Estudios previos han mostrado que el proceso de adhesión de las plaquetas de pacientes con HPN está reducido³¹ y que son refractarias a la

acción del ADP, similar a lo observado en otros procesos hemolíticos en los que el grado de lisis es inversamente proporcional a la adhesividad plaquetaria.³² Asimismo, la hiperreactividad plaquetaria se ha atribuido a mecanismos compensatorios entre una acción constante del complemento y una respuesta a la hiperestimulación crónica.³¹

La hiperreactividad plaquetaria observada para el grupo 1 no estuvo acorde con la concentración de éstas en sangre en comparación con los pacientes del grupo 2, quienes presentaron una cantidad ligeramente disminuida y una mayor reactividad de sus plaquetas circulantes. Sin embargo, los cambios observados en la función plaquetaria no estarían dependiendo directamente de la cantidad de las plaquetas circulantes, ya que la disminución entre ambos grupos de pacientes no resultó significativa ni fue tan marcada como lo observado en otros estudios.³¹

Los pacientes con HPN que acuden a la clínica de HPN del Hospital de Especialidades del CMN "La Raza" no han presentado trombosis, lo cual podría estar determinado por condiciones raciales, la naturaleza heterogénea de las plaquetas, así como por las altas concentraciones de ADP liberado de la lisis de glóbulos rojos que estimulan la liberación de óxido nítrico (NO) y que representa un potente vasodilatador e inhibidor de la adhesión plaquetaria.³³

La HPN es una enfermedad con una incidencia baja;^{6,34} sin embargo, ninguno de los estudios realizados puede explicar la ausencia de trombosis en la población mexicana; por lo que las perspectivas de estudio deberán encaminarse a evaluar el NO, así como el papel del endotelio vascular en estos trastornos.

Si bien, la severidad de un proceso hemolítico está en relación con los niveles séricos elevados de LDH, es importante considerar que la presencia de hemoglobina libre interfiere en la determinación de LDH, creatincinasa y aspartato aminotransferasa, entre otros, arrojando valores elevados falsos.³⁵ Por esta razón y de acuerdo con nuestros resultados sugerimos la determinación de P-selectina en pacientes con HPN como un parámetro más confiable para identificar hiperactividad plaquetaria y un posible riesgo trombótico.

REFERENCIAS

1. Endo M, Ware RE, Vreeke TM. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 86: 2546.
2. Rosse WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990; 75: 1595.

3. Kinoshita T, Inoue N, Kameda J. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995; 60: 57.
4. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzato L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253.
5. Holguin MH, Parker CJ. Membrane inhibitor of reactive lysis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 178: 61.
6. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Sosa-Muñoz-J, Castro-Sansores C, Delgado-Lamas JL, Vázquez-Villegas V. Historia Natural de la hemoglobinuria paroxística nocturna en adolescentes, adultos y en la edad pediátrica: la experiencia mexicana. *Sangre* 1997; 42: 171.
7. Socie G, Mary JY, de-Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet* 1996; 348: 573.
8. Nafa K, Bessler M, Mason P. Factor V Leiden mutation investigated by amplification created restriction enzyme site (ACRES) in PNH patients with and without thrombosis. *Haematologica* 1996; 81: 540.
9. Ray JG, Burrows RF, Ginsberg JS, Burrows EA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis: review and recommendations for management of the pregnant and nonpregnant patient. *Haemostasis* 2000; 30: 103.
10. Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol* 1991; 112: 407.
11. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 1992; 118: 1431.
12. White JG, Rao GHR. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol* 1998; 152: 597.
13. Tanaka K, Itoh K. Reorganization of stress fiber-like structures in spreading platelets during surface activation. *J Struct Biol* 1998; 124: 13.
14. Nachmias VT, Golla R. Vinculin in relation to stress fibers in spread platelets. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; 20: 190.
15. Bearer EL. Cytoskeletal domains in the activated platelet. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 30: 50.
16. Takubo T, Hino M, Suzuki k, Tatsumi N. Localization of myosin, actin, a-actinin, tropomyosin and vinculin in surface-activated, spreading human platelets. *Biothech Histochem* 1998; 73: 310.
17. Allen RD, Zacharaski LR, Widirstky ST, Rosestein R, Zaitlin LM, Burgess DR. Transformation and motility of human platelets. Details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *J Cell Biol* 1979; 83: 126.
18. Debus E, Weber K, Osborn M. The cytoskeleton of blood platelets view by immunofluorescence microscopy. *Eur J Cell Biol* 1981; 24: 45.
19. Mattson JC, Zuches CA. Elucidation of the platelet cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370: 11.
20. White JG. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. *Am J Pathol* 1984; 117: 207.
21. Zimmerman TS, Kolb WP. Human platelet-initiated formation and uptake of the C5-9 complex of human complement. *J Clin Invest* 1976; 57: 203.
22. Polley MJ, Nachman RL. Human complement in thrombin-mediated platelet function. *J Exp Med* 1979; 150: 633.
23. Weidmer T, Hall SE, Ortell TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82: 1192.
24. Gralnick HR, Vail M, McKeown LP, Merryman P, Wilson O, Chu I, Kimball J. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995; 91: 697.
25. Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1999; 93: 3451.
26. White JG, Clawson CC. The surface connected canalicular system of blood platelets – A fenestrated membrane system. *Am J Pathol* 1980; 101: 353.
27. Cerecedo MD. Participación del citoesqueleto en la activación y adhesión plaquetaria *in vitro*. Tesis doctoral ENCB, IPN. 2002.
28. Lewis JC, White MS, Prater T, Porter KR, Steele RJ. Three-dimensional organizations of the platelet cytoskeleton during adhesion *in vitro*: observations on human and non human primates cells. *Cell Motil* 1983; 3: 589.
29. Nachmias VT. Platelet and megakaryocyte shape change: triggered alterations in the cytoskeleton. *Semin Hematol* 1983; 20: 261.
30. Polley MJ, Nachman. The human complement system in thrombin-mediated platelet function. *J Expl Med* 1978; 147: 1713.
31. Grünwald M, Grünwald A, Schmid A, Schöpflin Ch, Schauer S, Griesshammer, Koksch M. The platelet function defect of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Platelets* 2004; 15: 145.
32. Dale J, Myhre E. Platelet functions in patients with aortic ball valves. *Am Heart J* 1977; 94: 359.
33. Wollny T, Iacoviello I, Buckzo W, de Gateano G, Donati MB. Prolongation of bleeding time by acute hemolysis in rats: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1977; 272: H2875.
34. Ware RE, Hall SE, Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 1991; 325: 991.
35. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 127.

Reimpresos:

Dra. Doris A. Cerecedo-Mercado

Laboratorio de Hematobiología
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Wilfrido Massieu Helguera 239
Col. La Escalera
07320, México, D.F.
Tel.: 5729 6300 Ext. 55531
Fax: 5729 6300 Ext. 55532
Correo electrónico: dcereced@prodigy.net.mx

Recibido el 27 de febrero de 2006.

Aceptado el 4 de agosto de 2006.