(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 610**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)
A61K 35/14 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009** **E 09768362 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2352815**

(54) Título: **Método para producir plaquetas**

(30) Prioridad:

04.12.2008 EP 08305881

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2016

(73) Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris , FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (25.0%);
UNIVERSITE PARIS DESCARTES (25.0%) y
L'UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT QUENTIN EN YVELINES (25.0%)

(72) Inventor/es:

BARUCH, DOMINIQUE;
CRAMER-BORDE, ELISABETH y
DUNOIS-LARDE, CLAIRE

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 569 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir plaquetas

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos maduros.

Estado de la técnica

La diferenciación de megacariocitos (MK) es un proceso continuo caracterizado por etapas secuenciales. La ploidía de MK aumenta a través de endomitosis, con un aumento paralelo en el tamaño celular. La síntesis de orgánulos de almacenamiento y de la membrana plasmática se potencia, produciendo la formación de membranas de demarcación. La maduración citoplasmática está asociada con un aumento marcado en el tamaño de MK. Finamente, el MK maduro experimenta reorganización completa del citoesqueleto con implicación de los microtúbulos, para inducir elongaciones pseudopodiales correspondientes a proplaquetas (Patel et al., 2005a; Richardson et al., 2005). Las plaquetas se liberan de las puntas de estas proplaquetas que contienen todos los orgánulos plaquetarios.

Las plaquetas en circulación están implicadas en la formación de trombos por adhesión a la pared de los vasos y por agregación sobre la primera capa de las plaquetas adherentes a la matriz subendotelial (Ruggeri, 2003). El factor de von Willebrand (VWF) es un constituyente principal de las células endoteliales que revisten la vasculatura. VWF es la única proteína capaz de detener las plaquetas en circulación en condiciones de altas velocidades de corte (>1000 s^{-1}). Las plaquetas fijadas se traslocan sobre VWF de matriz inmovilizado, a través de la unión de GPIb (también conocido como CD42b) al dominio A1 de VWF (Huizinga et al., 2002). La activación de la integrina αIIbβ3 (también conocida como CD41a/CD61), que aparece progresivamente durante la fijación transitoria de las plaquetas, implica señalización mediada por GPIb y permite la unión de αIIbβ3 a la secuencia RGD de VWF. El síndrome de Bernard-Soulier (BSS) es un trastorno hemorrágico caracterizado por trombocitopenia grave y plaquetas gigantes (Nurden, 2005). Se debe a anormalidades cuantitativas o cualitativas del complejo GPIb-IX-V, en particular de la subunidad GPIbα que contiene el sitio de unión a VWF. Se encuentran cantidades normales de MK en la médula ósea de pacientes con BSS, lo que sugiere que la macrotrombocitopenia observada en este entorno está relacionada con la formación deficiente de plaquetas a partir de los MK.

Como a menudo no se observa fragmentación de MK en plaquetas en el espacio medular, los MK necesitan migrar a los capilares de la medula ósea (Tavassoli y Aoki, 1981). El desprendimiento de plaquetas de las proplaquetas se ha descrito en ausencia de condiciones de flujo. Resulta curioso el hecho de que la producción de plaquetas desprendidas de MK cultivados en presencia de trombopoyetina (TPO) sea muy inferior a lo que podría esperarse en condiciones óptimas de maduración (Norol et al., 1998). Muchas etapas del desprendimiento de plaquetas siguen sin resolverse. En particular, nunca se ha demostrado el papel de las fuerzas de corte sobre la formación de plaquetas. Los receptores de VWF GPIb y de αIIbβ3 se expresan ambos en la superficie de MK durante la maduración (Debili et al., 1990). Se han identificado pocos MK maduros en la circulación sanguínea (Pedersen, 1978; Tavassoli y Aoki, 1981), donde están expuestos a VWF en el lado luminal de las células endoteliales.

Además, resulta curioso el hecho de que en condiciones óptimas de cultivo de MK, la producción de plaquetas desprendidas *in vitro* sea muy inferior a lo que podría esperarse de la gran producción de plaquetas diaria *in vivo*. Por tanto, existe una importante necesidad de disponer de un buen sistema de producción de plaquetas.

Objeto de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. En particular, se refiere a un método *ex vivo* para producir plaquetas, a partir de megacariocitos maduros, comprendiendo dicho método una etapa de someter una suspensión de megacariocitos maduros, a un flujo que tiene una velocidad de corte de al menos 600 s^{-1} en una fase sólida recubierta con factor de von Willebrand.

Descripción detallada de la invención

***Definiciones*:**

Como se usa en este documento, el término "plaquetas" indica los cuerpos citoplasmáticos anucleados derivados de células que están implicados en los mecanismos celulares de hemostasis primaria que conduce a la formación de coágulos sanguíneos.

Como se usa en este documento, el término "proplaquetas" indica cualquier forma estructural de un megacariocito o sus fragmentos, tales como partículas tipo plaqueta unidas de forma citoplasmática, que podrían producir la formación de plaquetas. Las formas estructurales incluyen, aunque sin limitación, células son largas extensiones citoplasmáticas, proyecciones o pseudopodios que contienen hinchamientos que abarcan cuerpos plaquetarios en

diversas fases de formación, tales como, nódulos, ampollas y similares.

Como se usa en este documento, el término" "megacariocito" indica una célula de médula ósea responsable de la producción de plaquetas sanguíneas necesarias para la hemostasis normal. Los megacariocitos se obtienen de células precursoras de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. La señal principal para la producción de megacariocitos es la trombopoyetina o TPO. TPO es necesaria para inducir la diferenciación de células progenitoras en la médula ósea hacia un fenotipo final de megacariocito. Otras señales moleculares para la diferenciación de megacariocitos incluyen GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, y eritropoyetina.

Como se usa en este documento, la expresión "megacariocitos maduros" indica una población de megacariocitos que expresan de un modo estable los marcadores superficiales GPIb y αIIbβ3. Como se usa en este documento, una "expresión de modo estable" de un marcador superficial indica que, en una población celular, al menos el 70 % de las células expresa estos marcadores superficiales.

Como se usa en este documento, la expresión "velocidad de corte" se refiere al parámetro usado para caracterizar el flujo laminar. En tubos el flujo laminar tiene un perfil de velocidad de flujo parabólico con velocidad de flujo creciente de las capas de transmisión adyacentes que alcanzan un máximo en el eje luminal. El aumento de la tasa de velocidad radial en capas adyacentes se define como la velocidad de corte. En una cámara de placa paralela la velocidad de corte se da por la fórmula (γ) y corresponde a un gradiente de velocidad en un material que fluye. La unidad SI de medición para la velocidad de corte es s^{-1}, expresada como "segundos recíprocos" o "segundos inversos". La fórmula de la velocidad de corte (γ) es:

$$\gamma = f(k)\ 6Q/ab^2$$

Donde γ es la velocidad de corte (en s^{-1}), Q es el caudal (ml/s), a = anchura de abertura (cm), b = altura de abertura (cm) y f (k) es una función de los parámetros físicos del sistema. Por ejemplo, usando una cámara de flujo de la instrumentación Maastricht (descrita en (Legendre et al., 2006)), f(k) es igual a 1,03 para velocidades de corte >100 s^{-1}. De ese modo, la velocidad de corte puede ajustarse controlando el caudal y la altura de abertura de la cámara.

En la circulación humana las velocidades de corte varían de 30-40 s^{-1}en las venas más grandes hasta 5000 s^{-1} en la microcirculación.

Como se usa en este documento, la expresión "factor de von Willebrand" o "VWF" indica la proteína multimérica que consiste en varios monómeros implicados en hemostasis. Una secuencia ejemplar de aminoácidos del factor humano de von Willebrand puede encontrarse en la base de datos GenPeptcon el número de acceso AAB594582. Preferiblemente, el factor de von Willebrand de acuerdo con la invención es un factor de mamífero de von Willebrand, incluso más preferiblemente un factor murino o un factor de primate, incluso más preferiblemente un factor humano de von Willebrand. El término "VWF" abarca VWF de cualquier origen de mamífero, tal como VWF de primate, preferiblemente VWFhumano. También puede ser VWF recombinante. Los expertos en la materia pueden producir fácilmente VWF recombinante de acuerdo con técnicas convencionales en la técnica.

De acuerdo con la invención, el factor VWF puede ser VWF recombinante VWF nativo. En su forma nativa, puede purificarse o puede estar comprendido en una composición que comprende otros componentes (por ejemplo, en una matriz extracelular).

También están cubiertos los fragmentos de VWF, variantes de VWF y análogos de VWF, donde dichos fragmentos, variantes y análogos tienen la capacidad de unirse a GPIb. Los fragmentos, variantes y análogos de VWF pueden incluir aunque sin limitación: el fragmento tríptico de 52/48 kDa de VWF (Fujimura et al., 1986) ; VWF digerido por la proteasa V-8 de *Staphylococcus aureus* (Girma et al., 1986a; Girma et al., 1986b); concentrados de VWF para uso terapéutico (Federici, 2005; Goudemand et al., 2005; Houdijk et al., 1986) tales como Haemate-P/Humate-P (de Behring), Wilfactin (de LFB; véase (Goudemand et al., 2005)) e Immunate (Baxter, Viena, Austria); y mutantes de VWF responsables de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N (que es deficiente en la unión del factor VIII).

Como se usa en este documento, la expresión " trastorno de recuento disminuido de plaqueta" indica un problema en la producción de plaquetas o una degradación aumentada de plaquetas que provoca una baja concentración de plaquetas o un problema debido a una función anormal de plaquetas que están en el intervalo normal. Como se usa en este documento una "baja concentración de plaquetas" indica una concentración inferior de 150.000 plaquetas por mm^3. De acuerdo con la invención, los trastornos de recuento disminuido de plaquetas incluyen, aunque sin limitación trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia relacionada con producción disminuida (origen central) y destrucción aumentada de cualquier causa (origen periférico).

Como se usa en este documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. Preferiblemente un sujeto de acuerdo con la invención, es un ser humano.

Método y dispositivo para producir plaquetas

La invención se refiere a un método ex vivo para producir plaquetas, que comprende una etapa de someter una suspensión de megacariocitos maduros a un flujo que tiene una velocidad de corte de la menos 600 s^{-1} en una fase sólida recubierta con factor de von Willebrand.

En una realización preferida, el flujo tiene una velocidad de corte de al menos 800 s^{-1}, preferiblemente al menos 1000 s^{-1}, preferiblemente al menos 1200 s^{-1}, preferiblemente al menos 1400 s^{-1}, incluso más preferiblemente al menos 1600 s^{-1}, al menos 1800 s^{-1} o al menos 2000 s^{-1}.

Típicamente el flujo tiene una velocidad de corte que no excede la velocidad de corte fisiológica a la que pueden someterse las plaquetas *in vivo*. Típicamente, dicha velocidad de corte no excede los 6000 s^{-1}, preferiblemente 4000 s^{-1}, incluso más preferiblemente 3000 s^{-1}.

En una realización, la suspensión de megacariocitos maduros presenta una concentración de células comprendida entre $0{,}5x10^6$ y $4x10^6$ por ml, preferiblemente al menos $1x10^6$ por ml, preferiblemente al menos 2 $x10^6$ células por ml, incluso más preferiblemente al menos 4 $x10^6$ por ml.

Típicamente, la suspensión de megacariocitos maduros comprende una población de megacariocitos suspendida en un medio de cultivo celular apropiado. En una realización, dicho medio de cultivo celular es medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM).

La suspensión de megacariocitos maduros puede obtenerse después de aislamiento de una muestra de sangre o muestra de médula ósea. Como alternativa, puede usarse una suspensión de líneas celulares estables de megacariocitos tales como DAMI (Greenberg et al., 1988), Meg-01 (Isakari et al., 2009), UT7/TPO (Barroga et al., 2008) en condiciones apropiadas. De acuerdo con la invención, la suspensión de megacariocitos maduros se somete a una velocidad de corte de al menos 600 s^{-1} para un tiempo de exposición suficiente para la producción de plaquetas. Típicamente, dicho tiempo de exposición puede estar comprendido entre 10 minutos y 2 horas, típicamente, entre 15 minutos a 1 hora, incluso más preferiblemente entre 15 minutos y 30 minutos. En una realización preferida, dicho tiempo de exposición es de aproximadamente 20 minutos.

En una realización particular, la fase sólida se recubre por incubación con una solución de factor de von Willebrand o fragmento o variante o análogo del mismo.

Típicamente, la concentración de VWF usada para recubrir la fase sólida es entre 5 y 100 µg/ml. En una realización preferida, la concentración de VWF es de 20 µg/ml.

En una realización, la fase sólida se recubre con un fragmento o variante o análogo seleccionado entre el grupo que consiste en fragmento tríptico de 42/48 kDa de VWF; VWF digerido con la proteasa V-8 de *Staphylococcus aureus*; concentrados de VWF para uso terapéutico y VWF de tipo silvestre recombinante o mutantes de VWF responsables de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N.

El método para producir las plaquetas a partir de megacariocitos maduros puede realizarse en una cámara de flujo, donde la cámara de flujo comprende una pared inferior recubierta con VWF o un fragmento o variante o análogo del mismo, donde dicho fragmento, variante o análogo del mismo se une a GPIb.

También se describe un dispositivo para producir las plaquetas a partir de megacariocitos maduros, comprendiendo dicho dispositivo una cámara de flujo que comprende una pared inferior recubierta con VWF o un fragmento o variante o análogo del mismo donde dicho fragmento, variante o análogo del mismo se une a GPIb.

En una realización preferida, la cámara de flujo consiste en una cavidad rectangular.

En una realización adicional. El fondo de la cámara de flujo es un cubreobjetos de vidrio recubierto con el factor de acuerdo con la invención.

En una realización adicional, la cámara de flujo usada para la producción de plaquetas puede ser la cámara descrita en (Mekrache et al., 2002) y (Legendre et al., 2006).

En otra realización, la cámara de flujo es un sistema de flujo de microfluidos tal como tubos microcapilares de vidrio (Kauskot et al., 2007), o un biochip de microfluidos y detector de flujo (Robinson et al., 2008; Williams et al., 2002), o cualquier otro tipo de sistema de flujo de microfluidos (véase, por ejemplo, Conant et al., 2009).

De forma ventajosa, algunas cámaras de flujo adecuadas para la invención permiten trabajar en condiciones estériles (véase, Williams et al., 2002 y Conant et al., 2009 por ejemplo). En una realización preferida, dicha cámara de flujo es estéril.

En una realización adicional, la velocidad de corte se obtiene gracias a una bomba eléctrica en la cámara de flujo.

Plaquetas y composiciones farmacéuticas:

Se describen adicionalmente plaquetas que se pueden obtener por el método descrito anteriormente.

En un objeto adicional de la presente descripción, las plaquetas que se pueden obtener por el método descrito pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica.

Por tanto, la presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende las plaquetas descritas en este documento. La composición farmacéutica generalmente puede incluir uno o más vehículos, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Dichas sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, o similares. Los vehículos adecuados típicamente son moléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, o polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos, o similares. Esta composición farmacéutica puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros aditivos tales como antioxidantes o gases inertes, estabilizantes o proteínas recombinantes (por ejemplo, albúmina sérica humana) adecuadas para administración *in vivo*.

Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según lo apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico.

Además, las plaquetas de acuerdo con la presente descripción y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción pueden usarse para el tratamiento de trastornos de recuento disminuido de plaquetas, en particular trombocitopenia y trombocitopatía. Por ejemplo, las plaquetas que se pueden obtener por el método de acuerdo con la presente descripción pueden transfundirse en una cantidad eficaz a un sujeto que padece un trastorno de producción de plaquetas.

En una realización preferida, el trastorno de recuento disminuido de plaquetas puede seleccionarse entre el grupo que consiste en trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia relacionada con producción disminuida (origen central) o destrucción aumentada de cualquier causa (origen periférico).

Un aspecto relacionado descrito en este documento se refiere a un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno de recuento disminuido de plaquetas, comprendiendo dicho método una etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de plaquetas de acuerdo con la presente descripción (o una población de las mismas o una composición farmacéutica de las mismas).

En el contexto de la descripción, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, se refiere a un método que está dirigido a retardar o prevenir la aparición de una patología, a revertir, a aliviar, inhibir, ralentizar o detener la progresión, agravamiento, o deterioro de los síntomas de la patología, a conseguir mejoras de los síntomas de la patología, y/o a curar la patología.

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a cualquier cantidad de plaquetas de acuerdo con la presente descripción (o una población de las mismas o una composición farmacéutica de las mismas) que es suficiente para conseguir el propósito pretendido.

Las dosificaciones y regímenes de administración eficaces pueden determinarse fácilmente mediante una buena práctica médica en base a la naturaleza de la patología del sujeto, y dependerá de varios factores incluyendo, aunque sin limitación, el grado de los síntomas de la patología y el grado de daño o degeneración del tejido u órgano de interés, y las características del sujeto (por ejemplo, edad, peso corporal, género, salud general, y similares).

Para terapia, pueden administrarse plaquetas y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción de forma sistémica, por administración intravenosa. La dosis y la cantidad de administraciones pueden optimizarse por los expertos en la materia de un modo conocido.

Además, pueden usarse plaquetas de acuerdo con la presente descripción para propósitos de diagnóstico. Pueden usarse como control normal para la normalización de la función plaquetaria.

El ensayo de función plaquetaria requiere plaquetas sanguíneas frescas en condición funcional nativa de individuos normales e individuos afectados. La enfermedad de von Willebrand es la única causa más común de trastorno hemorrágico. Además, hasta el 50 % de los trastornos hemorrágicos mucocutáneos están causados por un trastorno de la función plaquetaria. La normalización del ensayo de función plaquetaria requiere que el laboratorio realice un

control normal con cada lote de ensayos de función plaquetaria realizados. Sin embargo, el muestreo continuo de sangre normal por venipunción genera varias preocupaciones para la salud y cuestiones éticas. La evaluación en laboratorio de las funciones plaquetarias incluye agregación por transmitancia de luz y ensayo de liberación de ATP, ensayos de glucoproteína, microscopia electrónica, ensayo de la función procoagulante, ensayos genéricos (Pai y Hayward, 2009).

Por lo tanto, se describe un método para diagnosticar un trastorno plaquetario que comprende la etapa de usar plaquetas de acuerdo con la presente descripción para normalizar la función plaquetaria.

Típicamente, las plaquetas de acuerdo con la presente descripción pueden obtenerse de líneas celulares de megacariocitos como se ha descrito anteriormente. Después se usan para normalizar la función plaquetaria en un ensayo de diagnóstico *in vitro*. En otras palabras, se usan como control positivo en un ensayo de diagnóstico *in vitro* para medir la función plaquetaria.

La invención se ilustrará adicionalmente a través de los siguientes ejemplos, figuras y tablas.

Figuras:

Figura 1: Cuantificación de la formación de proplaquetas a alta velocidad de corte, efecto de inhibidores y superficies adhesivas. Se perfundieron células suspendidas en IMDM en VWF a 1800 s^{-1} durante diez minutos, después se perfundió IMDM en solitario durante 10 minutos. La adhesión condujo a cambios en la forma principal de las células y a formación de proplaquetas. El panel A muestra las dos fases de deformaciones de MK en condiciones de corte precedentes a las proplaquetas y liberación de plaquetas, en comparación con MK no deformados (fase 1); la deformación prematura se caracterizó por elongación del citoplasma (fase 2); la fase 3 incluye deformación tardía de los MK con reorganización del citoesqueleto en un polo de la célula o ambos extremos, un largo filamento delgado de "sarta de cuentas" sucesivas, la célula después se rompe en regiones delgadas. La exposición adicional a corte generó plaquetas aún asociadas con largas hebras citoplasmáticas o parejas de plaquetas, así como plaquetas redondeadas. La cuantificación se muestra en el panel B: (a), los cambios de forma de MK se clasificaron en cuatro categorías: 1) MK en traslocación; 2) MK en deformación prematura con pérdida de esfericidad; 3) MK en deformación tardía y elongación de proplaquetas; 4) fragmentación de proplaquetas y formación de plaquetas. Panel b-f: distribución de células en cada categoría respecto a la cantidad total de células contadas en 10 campos, como función del tiempo de perfusión. En ausencia de inhibidor, modificaciones de distribuciones de MK de sangre de cordón umbilical (panel b) o MK de médula ósea (panel c) perfundieron en VWF. La perfusión de MK de sangre de cordón umbilical en VWF en presencia de inhibidores de la interacción GPIb-VWF, un anticuerpo de bloqueo contra la glicocalicina (panel d), o MoAb anti-VWF (panel e), indicó una inhibición principal del contacto de MK en VWF y de las etapas posteriores, suprimiendo de ese modo la formación de proplaquetas. Abciximab, que bloquea la interacción de αIIbβ3 con VWF, evitó la formación de proplaquetas y plaquetas (panel f). Representativo de 15 experimentos. La barra representa 10 µm.

Figura 2: Aspecto por microscopia óptica de MK de sangre de cordón umbilical adherentes a cubreobjetos recubiertos con VWF en condiciones de corte o estáticas. Se recubrieron cubreobjetos de la cámara de flujo y se aclararon con PBS antes de fijación en metanol enfriado en hielo y posterior tinción de Romanovsky. Después de exposición a altas velocidades de corte durante 20 min, numerosos MK presentaban extensiones de proplaquetas largas y delgadas orientas paralelas al flujo. Una única proplaqueta larga y unipolar se extiende desde el núcleo celular con brotes en su extremidad y a lo largo del eje (panel izquierdo). Como control del efecto de alta velocidad de corte, se depositaron MK sobre VWF y se incubaron en condiciones estáticas durante 20 min, se retiraron las células no adherentes y se aclaró el cubreobjetos con IMDM. Las células presentaban una forma esférica, sin ninguna extensión de proplaqueta (panel derecho). Aumento x 500.

Figura 3: Papel de los microtúbulos en la formación proplaquetas inducida por corte. Panel A: marcaje por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos antitubulina que muestran formación de proplaquetas y plaquetas. Los MK expuestos a una velocidad de corte de 1800 s^{-1} en una superficie recubierta con VWF se fijaron y tiñeron con faloidina (paneles de la izquierda) y anticuerpos antitubulina (paneles de la derecha). Se analizaron las imágenes con un microscopio confocal. No es visible colocalización entre actina y tubulina. Panel B: un MK que desprende plaquetas extiende una proplaqueta larga y delgada con una extremidad hinchada de tamaño de plaqueta. El eje de proplaqueta completo, así como su punta, se marca para tubulina. Dos fragmentos celulares desprendidos presentan marcaje característico de tubulina: delinea la proplaqueta con forma de mancuerna y su estrechamiento central mientras que el fragmento con tamaño de plaqueta muestra un patrón de marcaje circular. Panel C: efecto de inhibidor de microtúbulos sobre proplaquetas. La reversión de la elongación de proplaquetas se caracteriza por desorganización de tubulina.

Figura 4: Ultraestructura de MK expuesto a altas velocidades de corte que conducen a formación de plaquetas. Se recogieron suspensiones celulares efluentes en fijador directamente de la salida de la cámara de perfusión y se procesaron para microscopia electrónica como se describe en la sección de métodos. Los MK maduros estaban alargados, extendiendo filopodios citoplasmáticos largos que encerraban microtúbulos

longitudinales paralelos (recuadro). Estas proplaquetas mostraban hinchamientos regulares que contenían orgánulos citoplasmáticos. Un fragmento citoplasmático esférico grande, probablemente una proplaqueta desprendida (pp) estaba localizado en las cercanías (panel a). Los lóbulos nucleares (N) que contenían cromatina densa se alargaron y se localizaban en un polo de la célula. Los núcleos desnudos con una forma oval y lóbulos nucleares compactos que contenían cromatina densa, que normalmente están ausentes de cultivo de MK, se recuperaron en los efluentes (panel b). Las proplaquetas (PP) rellenas de orgánulos citoplasmáticos aparecieron como fragmentos citoplasmáticos grandes, desprovistos de núcleos, casi esféricos, con forma de mancuerna o alargados con extremidades delgadas (paneles c y d). Se observaron varios fragmentos aislados con tamaño de plaqueta (P) (panel e). La barra representa 2 µm.

Figura 5: Especificidad de VWF y altas velocidades de corte en formación de proplaquetas.
Panel A: imágenes de contraste de fase de MK que forman plaquetas en un cubreobjetos cubierto de VWF en condiciones estáticas (paneles superiores) y a una alta velocidad de corte (paneles inferiores). Se formaron proplaquetas en 14 h y fueron máximas en 16 h en condiciones estáticas, pero requerían solamente 10 min en flujo. Panel B: monocapas de HUVEC soportaban adhesión de MK incluso en ausencia de activación (paneles superiores), mientras que se observaba formación de proplaquetas después de activación de HUVEC (paneles inferiores). Panel C: las deformaciones de MK y formación de proplaquetas en superficies no VWF eran mínimas en condiciones de corte como se muestra por fibrinógeno, fibronectina y colágeno.

Figura 6: Las plaquetas obtenidas de exposición de MK a altas velocidades de corte pueden activarse por trombina.
Se analizaron efluentes celulares en el flujo continuo de MK expuestos a altas velocidades de corte en un ensayo de adhesión de fibrinógeno en condiciones estáticas, seguido por microscopia confocal, con tinción celular con faloidina-Alexa 546 para visualizar actina y Alexa 488 para visualizar αIIbβ3. Las plaquetas derivadas de MK generadas por exposición a corte (paneles superiores) se adherían a fibrinógeno en ausencia (paneles de la izquierda) o en presencia de trombina (paneles de la derecha). Las células no activadas presentaban tinción difusa de actina y localización en membrana de αIIbβ3. Después de la activación de trombina, los filamentos de actina se organizaban como fibras de estrés. Presentan una organización citoesquelética similar que plaquetas sanguíneas lavadas preparadas en un ensayo diferente sin exposición a corte (paneles inferiores). La barra representa 10 µm.

Figura 7: Plaquetas liberadas activadas por trombina expresan P-selectina. Se activaron efluentes celulares o no, por trombina como se describe en la leyenda de la figura 6, y se analizaron en un ensayo de citometría de flujo. Las muestras se marcaron con anti-CD62P-FITC (FL1, P-selectina) y anti-CD41-PE (FL2, αIIb). Se usaron ajustes de perfiles de FSC-SSC de plaquetas lavadas para analizar las células del flujo continuo (MK del panel superior izquierdo: expuestos a corte; panel inferior izquierdo: plaquetas lavadas). Histograma de células doble positivas a CD62P y CD41, en regiones R1, R2 y R3 obtenidas de gráficos de puntos (*dot-plot*) en ausencia (barras vacías) o en presencia de trombina (barras rellenas). Solamente las muestras activadas con trombina contenían células CD62P positivas, mientras que todas las muestras eran positivas para CD41a (panel superior derecho). Representación de histograma de plaquetas activadas (R1) en el flujo continuo, en presencia de trombina, después de marcaje con IgG no inmune (línea delgada, fondo gris), anti-CD62P o anti-CD41a (línea gruesa) (panel inferior derecho).

Figura 8: Modificaciones ultraestructurales de plaquetas derivadas de MK después de activación con trombina. Se activaron efluentes celulares o no por trombina, y se estudiaron por microscopia electrónica. En ausencia de trombina, los fragmentos de tamaño de plaqueta mostraban una superficie lisa y contenían varios gránulos alfa (A) dispersados en todo el citoplasma, así como cisternas SCCS diferenciadas (panel a). En presencia de trombina, los fragmentos con tamaño de plaqueta presentaban cambios morfológicos característicos de plaquetas activadas, concretamente una forma esférica, pseudopodios superficiales (p), material denso dentro de las cisternas dilatadas de SCCS, sin granulación en el citoplasma y un haz central de microfilamentos, reminiscente de plaquetas sanguíneas activadas (panel b). La barra representa 2 µm.

Ejemplo:

<u>Material y métodos</u>

Proteínas

El VWF se obtuvo de una donación del Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (Lille, Francia). El fibrinógeno se obtuvo en Hyphen BioMed (Neuville-sur-Oise, Francia). El VWF y el fibrinógeno humano se purificaron y se redujeron de fibronectina contaminante y de fibrinógeno y VWF, respectivamente (Legendre et al., 2006). El colágeno de tendón equino procedía de Nycomed (Munich, Alemania) y el fibrinógeno humano de VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia). El VWF recombinante (rVWF) de tipo silvestre y mutado (V1316M tipo 2B) se obtuvieron como se describe en cualquier otra parte (Ajzenberg et al., 2000).

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal (MoAb) 713, que bloquea la unión de VWF a GPIbα en presencia de ristocetina, fue una donación amable del Dr. JP Girma (INSERM Unit 770, Le Kremlin- Bicetre, Francia) (Ajzenberg et al., 2000). El anticuerpo policlonal antiglicocalicina, el dominio extracelular de GPIbα que contiene el sitio de unión a VWF, fue una donación amable del Dr. MC Berndt (Monash University, Melbourne, Australia) (Cramer et al., 1991). El anticuerpo anti-CD62P (P-selectina) conjugado con ficoeritrina (PE), el anticuerpo anti-CD41a (αIIb) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), el anticuerpo anti-CD42b (GPIbα) y los anticuerpos no inmunitarios procedían de Beckman Coulter (Villepinte, Francia). Los MoAb Anti-α y β-tubulina procedían de Amersham (Orsay, Francia). El MoAb anti-integrina β3 P37 fue una donación del Dr. González-Rodríguez (CSIC, Madrid, España) (Calvete et al., 1991). El Fab anti-αIIbβ3 (C7E3) Abciximab (Reopro®) procedía de Lilly (Suresnes, Francia).

Megacariocitos humanos

Los MK humanos usados en este estudio se cultivaron a partir de células precursoras aisladas de sangre de cordón umbilical o de médula ósea. Las muestras de médula ósea humana (recogidas durante cirugía de cadera), y las muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvieron después del consentimiento informado de acuerdo con nuestro comité de ética institucional (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) y de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las células CD34+ de sangre de cordón umbilical y de médula ósea humanas se separaron por una técnica inmunomagnética (StemCell Technologies, Grenoble, Francia) como se ha descrito previamente (Fichelson et al., 1999). Las células se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) complementado con sustituto de suero BIT 9500 al 15 % (StemCell Technologies) y 20 nmol/l de agonista de péptido TPO AF13948 (Genosys-Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia). Se añadieron una vez diez ng/ml de factor de células madre (SCF) (Amgen, Neuilly-sur-Seine, Francia), en el primer día de cultivo. Los MK cultivados durante 10 a 16 días en presencia de TPO estaban completamente maduros y dotados para biogénesis de plaquetas (Patel et al., 2005a). Se demostró por citometría de flujo que las células expresaban GPIb y αIIbβ3 (60-70 % de células positivas). Para experimentos de corte, las células se usaron entre el día 10 y 16.

Plaquetas humanas

Se obtuvo sangre de individuos sanos que no habían ingerido ninguna medicación durante las dos semanas previas. Se extrajo sangre en dextrosa con citrato ácido (ACD) al 15 % (v/v) pH 5,8. Se prepararon plaquetas lavadas a partir de plasma rico en plaquetas aisladas (PRP) en presencia de apirasa (1 U/ml) (Sigma) y ACD (1 ml para 40 ml) (Ajzenberg et al., 2000). En resumen, después del lavado, las plaquetas se resuspendieron en tampón Hepes (10 mmol/l de Hepes (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[etanosulfónico]), 136 mmol/l de NaCl, 2,7 mmol/l de KCl y 2 mmol/l de MgCl2) pH 7,5 que contenía albúmina sérica bovina al 0,15% (BSA). Las plaquetas se contaron con un contador electrónico de partículas (Modelo Z1, Coulter Electronics, Margency, Francia), y se ajustó la concentración a 1,5 x 10^8 plaquetas/ml.

Megacariocitos y plaquetas de ratón

Se usaron ratones C57BL/6J de tipo silvestre de 7-10 semanas de vida. Los cuidados y procedimientos en animales fueron de acuerdo con las directrices institucionales. Los megacariocitos se expandieron y separaron de médulas óseas lavadas abundantemente. En resumen, se cultivaron células Lin- purificadas de forma inmunomagnética en medio apropiado de diferenciación de megacariocitos en presencia de péptido TPO. Después de 6 días en cultivo, se introdujeron los megacariocitos maduros en una cámara de flujo en miniatura (Conant et al., 2009) y se perfundieron sobre VWF recombinante de ratón inmovilizado (Marx et al., 2008) a altas velocidades de corte.

Estudios de perfusión

Usando una cámara de flujo publicada previamente, obtenida en Maastricht Instrumentation (Legendre et al., 2006), se realizaron estudios de perfusión. La cámara de flujo consistía en una cavidad rectangular de 0,05 mm de altura, 29 mm de longitud, y 5 mm de anchura, tallada en un bloque de Plexiglás. El fondo de la cámara estaba revestido con un cubreobjetos de vidrio recubierto durante una noche a 4 ºC con VWF (20 µg/ml) diluido en solución salina tamponada con Tris (TBS, 25 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mmol/l de NaCl). En algunos experimentos, se ensayó otra proteína purificada (fibronectina, fibrinógeno, colágeno o rVWF de tipo 2B). Los MK en suspensión en IMDM (2 ml) a una concentración de 0,8-1 x 10^6 células/ml se extrajeron en una microjeringa estanca a gas de vidrio de 5 ml (Exmine, Ito Corporation, Fuji, Japón) conectada a la cámara con un ajuste de extensión (Steritex, Codan, Lensahn, Alemania). Se aplicó un caudal de 225 µl/min con una bomba eléctrica, generando una velocidad de corte de 1800 s^{-1}. Las células se perfundieron durante 10 minutos, seguido por perfusión con IMDM a la misma velocidad de corte durante 10 min. Todos los experimentos se realizaron a 37 ºC mantenidos con un sistema de calentamiento Minitüb (Minitüb Abfüll und Labortechnik, Tiefenbach, Alemania). En algunos experimentos, se preincubaron las células o cubreobjetos con anticuerpos durante 10 min antes de la perfusión. Después del final de la perfusión, se fijó el cubreobjetos con metanol enfriado en hielo durante 5 min, se lavó con agua destilada, se secó, y se tiñó. Los efluentes se recogieron a la salida de la cámara para estudios adicionales, incluyendo activación de trombina.

Sistema de videomicroscopia

La cámara de perfusión se colocó en la plataforma de un microscopio invertido (Axiovert 135, Zeiss, Alemania). Se usó una cámara CCD (Sony, Tokyo, Japón) para visualizar las células, usando un objetivo de contraste de modulación Hoffman 20x. Se realizó grabación continua con un grabador de imágenes digital (Replay Software, Microvision Instruments, Evry, Francia) conectado a un temporizador de video (VTG, Tokyo, Japón). Las secuencias de imagen se analizaron con el software de cuantificación Histolab o Videomet (Microvision Instruments).

Estudios de activación celular y citometría de flujo

Se recogieron suspensiones celulares efluentes en presencia de 0,5 mmol/l de EDTA a 1800 rpm durante 12 min, y se resuspendieron los sedimentos en IMDM. Se incubaron las alícuotas en ausencia o presencia de trombina (0,5 U/ml) durante 10 min a 37 ºC. Las células en suspensión (100 µl) se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con anticuerpo FITC-anti-CD62P y PE-anti-CD41a (5 µl de cada uno) o anticuerpo de control conjugado no inmune, antes de añadir 300 µl de PBS. Las células después se analizaron con un citómetro de flujo FACSort (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, Francia); se adquirieron 10.000 eventos con ajustes sobre la región de plaquetas identificada por su perfil característico en un diagrama de dispersor de ángulo recto (SSC) y dispersor de ángulo de avance (FSC) determinado en experimentos diferentes con plaquetas lavadas no estimuladas.

Inmunofluorescencia confocal

Se añadieron alícuotas (150 µl) de células inactivadas y activadas con trombina a portaobjetos de cámara Lab-Tek de vidrio recubiertos con fibrinógeno (Nunc, Rochester, NY) incubados durante 30 min en condiciones estáticas. Se retiraron las células no adherentes y se lavaron los portaobjetos tres veces con PBS, antes de fijación con paraformaldeído al 2 % (Carlo Erba, Val de Reuil, Francia) en PBS durante 30 minutos y almacenamiento a 4 ºC. Para tinción inmunofluorescente, las células se permeabilizaron durante 5 min con Triton X-100 al 0,1 % en PBS, después se incubaron durante 30 min con el MoAb anti-β3 P37 (10 µg/ml en PBS), se lavaron e incubaron con 20 µg/ml del anticuerpo secundario conjugado a AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). El control negativo usó IgG purificada de fluido ascítico de ratón a la misma concentración de proteína. Para marcaje de actina, se incubaron células permeabilizadas a temperatura ambiente durante 30 min con 50 µl de 30 nmol/l de AlexaFluor 546 faloidina (Molecular Probes) en PBS que contenía BSA al 3 %. Los cubreobjetos después se lavaron dos veces y se montaron en solución de montaje que contenía TOTO3 y Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, RU). Se analizó la tinción con AlexaFluor 488/AlexaFluor 546 con un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS.

Microscopia electrónica

Se recogieron suspensiones celulares efluentes en fijador de glutaraldehído (concentración final del 1,5 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) directamente a la salida de la cámara de perfusión, después de pase sobre diversas matrices y después se procesaron para microscopia electrónica como se ha descrito previamente (Cramer et al., 1997). Algunas muestras primero se activaron por trombina como anteriormente y se trataron adicionalmente para microscopia electrónica. El examen se realizó en un microscopio electrónico Jeol 10-11 (Jeol Ltd, Tokyo, Japón).

Estadística

Se usó ensayo *t* de Student para muestras no relacionadas para análisis estadístico; valores P <0,05 se consideraron significativos. Las barras de error representan el error típico de la media (ETM).

Resultados

Interacciones dinámicas de MK con VWF

Se perfundieron MK maduros de sangre de cordón umbilical a velocidades de corte variables sobre una superficie recubierta con VWF purificado. A 1800 s^{-1}, los MK establecían interacciones transitorias con VWF, ralentizando la velocidad de rodamiento de los MK sobre VWF y conduciendo progresivamente a cambios morfológicos profundos que finalmente condujeron a desprendimiento de plaquetas de los MK. Las diferentes etapas de la formación de plaquetas se resumen en la figura 1A. El proceso comienza con MK casi esféricos, después la periferia de la célula se deforma y llegan a ser visibles pseudopodios en MK adherentes (fase 2). Después tiene lugar la elongación del citoplasma, organizado a lo largo del flujo, y la parte posterior y/o la parte anterior del cuerpo celular (fase 3). Empiezan a aparecer hinchamientos intermedios con un aspecto característico de sarta de cuentas. La elongación sucedía rápidamente, a una velocidad de 21 µm/min, por tanto 25 veces mayor que la presentada en condiciones estáticas (Patel et al., 2005b). Curiosamente, la fragmentación sucedía no solamente en la punta de estas extensiones, sino también entre los hinchamientos, en particular en constricciones más delgadas que liberaban fragmentos de tamaños variables, y muy a menudo varias cuentas aún unidas juntas, pero desprovistas del cuerpo celular principal (figura 1A). Finalmente, estos fragmentos se descomponían adicionalmente en partículas más pequeñas, el tamaño de una plaqueta, claramente visible durante puntos temporales posteriores (figura 1A). La fragmentación de proplaquetas sucedía rápidamente en 15-20 min en condiciones de alta velocidad de corte. Se

obtuvieron resultados similares usando MK derivados de sangre de cordón umbilical o MK derivados de médula ósea. En contraste, en ausencia de flujo o a velocidades inferiores de corte (<1000 s^{-1}), no se observaban proplaquetas y liberación de plaquetas durante el período de 20 min de contacto de los MK con VWF. La exposición a corte de MK inmaduros, cultivados menos de 9 días, no permitía la traslocación y fragmentación.

Especificidad de interacción de VWF con receptores de MK en formación de plaquetas

Se definieron cuatro categorías celulares para cuantificar los cambios morfológicos durante la exposición a corte: 1) MK de traslocación; 2) MK de deformación prematura con pérdida de esfericidad; 3) MK de deformación tardía con elongación de proplaquetas; y 4) fragmentación de proplaquetas y liberación de plaquetas (figura 1B, panel a). Hubo un aumento gradual en la proporción de células alargadas y proplaquetas y plaquetas, alcanzando el 27,6 ± 4,9 % de las células a los 20 min. Este aumento reflejaba la diminución en las células de traslocación del 28,2 ± 6,5 a los 5 min al 3,6 ± 1,6 % a los 20 min, y la disminución en los MK de deformación prematura (figura 1B, panel b). Se obtuvieron resultados similares a los descritos con MK de sangre de cordón umbilical cuando se medía la distribución de los MK de médula ósea expuestos a alta velocidad de corte (figura 1B, panel c). La traslocación de los MK y posteriores etapas incluyendo la formación de proplaquetas y liberación de plaquetas se anularon completamente en presencia de un anticuerpo dirigido contra la glicocalicina o el dominio de unión a GPIb de VWF (figura 1B, paneles d y e), lo que demuestra la importancia crucial de la interacción VWF-GPIb. En presencia del inhibidor de αIIbβ3 Abciximab, la proporción de células sin proplaquetas (MK sin deformación y de deformación prematura) permaneció constante en el tiempo, mientras que la elongación de proplaquetas se reducía fuertemente y la formación de plaquetas se anulaba casi completamente (figura 1B, panel f). Esta ineficaz formación de proplaquetas se debía a la pérdida de contacto con la superficie de VWF (datos no mostrados).

Caracterización de formación de plaquetas inducida por exposición de MK a una alta velocidad de corte

Las velocidades de corte aplicadas a MK maduros indujeron cambios morfológicos específicos en comparación con un control realizado incubando las células en condiciones estáticas durante 20 minutos en VWF, donde la morfología de los MK permanecía inalterada con respecto a la de las células antes del contacto con VWF (Figura 2). En contraste, la tinción post-fijación de cubreobjetos recubiertos con VWF después de 20 minutos de perfusión de MK mostró que los MK prolongaban largos filopodios en la punta y que se formaban espigas de tipo plaqueta en cuentas a lo largo del eje, así como fragmentos citoplasmáticos más grandes (Figura 2). La elongación de proplaquetas requiere el deslizamiento de microtúbulos solapantes que tiñen para tubulina α y β1 (Patel et al., 2005b). Se descubrió que se teñían extensiones de MK por anticuerpo anti-tubulina en diferentes territorios de la actina, lo que confirma que estas extensiones presentaban tinción similar identificada en MK que forman proplaquetas por el trabajo de Italiano et al. (Italiano et al., 2003; Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a; Patel et al., 2005b); el marcaje de tubulina seguía el eje de proplaquetas en MK alargados y presentaba un patrón anular en MK esféricos, sobre proplaquetas y sobre plaquetas (Figura 3B). La importancia de los microtúbulos en la formación de plaquetas inducidas por corte, se confirmó por pre-incubación con Nocodazol, un inhibidor del ensamblaje de microtúbulos, que evitaba completamente la elongación de MK y la formación de proplaquetas en condiciones de flujo (datos no mostrados). Para demostrar que el Nocodazol no estaba actuando sobre plaquetas preformadas en suspensiones celulares, se añadió el inhibidor de microtúbulos después de la elongación; el efecto visualizado a tiempo real mostró que Nocodazol podía revertir la elongación inducida por corte cuando se añadía después de que hubiera sucedido el proceso. La especificidad de la reversión se confirmó por tinción de tubulina. Curiosamente, después de adición de Nocodazol a los 25 minutos, la tubulina ya no estaba organizada como se observa en proplaquetas y plaquetas, indicando por tanto que los procesos elongados eran diferentes de las fijaciones (Figura 3C). De hecho, las fijaciones de membrana eran estructuras dinámicas que se extendían desde contactos de adhesión localizados pequeños bajo la influencia de flujo, que se inducen por interacción de VWF-GP Ib, pero no presentan ninguna tinción de tubulina (Dopheide et al., 2002).

La microscopia electrónica mostró ejes citoplasmáticos largos que se extienden desde el núcleo celular, que contienen haces paralelos de microtúbulos y a veces estaban hinchados con orgánulos citoplasmáticos (Figura 4, panel a). Los glóbulos nucleares con heterocromatina densa estaban localizados en un polo de la célula y se observaban ocasionalmente núcleos desnudos (Figura 4, panel b). Grandes fragmentos citoplasmáticos, desprovistos de núcleos, eran casi esféricos, con forma de mancuerna o elongados con extremidades delgadas (Figura 4, panel c y d). También eran visibles fragmentos tipo plaqueta (Figura 4, panel e).

La formación de proplaquetas se acelera por alta velocidad de corte y VWF

Recientemente se ha demostrado que las proteínas adhesivas están implicadas en la regulación de la formación de proplaquetas; en particular, la formación de proplaquetas sucedía 16 horas después de la siembra de MK en VWF en condiciones estáticas (Balduini et al., 2008). Como se muestra en la Figura 5A, se obtuvieron hallazgos similares. En contraste, en presencia de alta velocidad de corte, el proceso sucedía muy rápidamente, ya que, en 20 minutos, el 70 % de los MK de sangre de cordón umbilical y el 80 % de los MK de médula ósea formaban proplaquetas. Este efecto era dependiente del grado de velocidad de corte (600-2400 s^{-1}) y de la concentración celular (0,5-2 x 10^6/ml). Las células endoteliales contienen multímeros de alto peso molecular de VWF que se liberan de forma constitutiva a una tasa baja y está aumentada en afecciones inflamatorias (Rondaij et al., 2006). Por lo tanto, se evaluó si el VWF

liberado de una matriz de células endoteliales soportaría la adhesión de MK y formación de proplaquetas. Los MK rodaban y se adherían a HUVEC no estimuladas, pero la formación de proplaquetas sucedía en HUVEC estimuladas (Figura 5B). La formación de proplaquetas sucedía también sobre la matriz de células endoteliales subyacente a la capa de células endoteliales, y está presente una vez se retiran estas células endoteliales. Además, se estudió la formación de proplaquetas a partir de MK perfundidos sobre una superficie recubierta con un rVWF de tipo 2B mutado. Se seleccionó la sustitución V1316M, una mutación bien definida, caracterizada por unión potenciada de VWF a GPIb de plaquetas con trombocitopenia leve y plaquetas gigantes (Ajzenberg et al., 2000; Miura et al., 2000). Se descubrió que la velocidad media de translocación de MK en rVWF tipo 2B (4,6 ± 0,3 mm/s) era muy inferior que en rVWF de tipo silvestre (wt) (33,6 ± 2,5 mm/s, p<0,0001). Todas las etapas de formación de proplaquetas por MK expuestos a altas velocidades de corte fueron más lentas sobre rVWF-2B que sobre rVWF-wt, conduciendo a una producción disminuida de plaquetas y una acumulación aumentada de proplaquetas (datos no mostrados). Finalmente, para establecer adicionalmente la especificidad de la superficie adhesiva en la regulación de formación de proplaquetas, se examinó el grado de formación de proplaquetas por MK perfundidos sobre fibrinógeno, colágeno o fibronectina a una alta velocidad de corte. No se formaron proplaquetas sobre estas superficies; el único cambio fue una leve deformación prematura de MK sobre fibrinógeno (Figura 5C).

Las plaquetas generadas por exposición a corte de MK son funcionales

La adhesión de plaquetas a fibrinógeno mediada por integrina αIIbβ3 sucede en ausencia de activación y se refuerza tras activación por trombina de este receptor. Para confirmar que plaquetas generadas por exposición a corte de MK eran estructural y funcionalmente similares a plaquetas sanguíneas, se compararon células recogidas en el flujo continuo con plaquetas sanguíneas aisladas, en un ensayo de adhesión estática a fibrinógeno (Mazharian et al., 2007). Las células eran firmemente adherentes a fibrinógeno en ausencia de trombina, lo que demuestra que αIIbβ3 era funcional en plaquetas y proplaquetas inducidas por corte. Elementos no activados presentaban tinción difusa de actina y localización en membrana de αIIbβ3. Después de la activación por trombina, se reorganizaban los filamentos de actina tanto en elementos nucleados como anucleados, mostrando formación de lamelipodios y filopodios, y tinción en membrana de integrina (Figura 6). Estas plaquetas derivadas de MK generadas por exposición a corte presentaban una organización citoesquelética similar que las plaquetas sanguíneas lavadas preparadas en un ensayo diferente sin exposición a corte (Figura 6).

El análisis por citometría de flujo de células expuestas a corte mostró tres poblaciones de células CD41 positivas, de acuerdo con su tamaño. La población de tamaño más pequeño solapaba con la de plaquetas sanguíneas, mientras el intermedio correspondía a elementos más grandes, incluyendo proplaquetas y núcleos desnudos (Figura 7). Por tanto, la población de plaquetas producida por exposición a corte incluye una proporción mayor de plaquetas de tamaño intermedio, en comparación con plaquetas aisladas de sangre periférica. Los MK cortados pertenecían a la misma población de tamaño grande que los MK no cortados. En respuesta a estimulación con trombina, se observó regulación positiva de P-selectina (CD62P) sobre la superficie de plaquetas derivadas de corte (11,8±1,8 % en comparación con 6,2±0,9 % para plaquetas no activadas, p=0,0005). De forma similar con las plaquetas sanguíneas aisladas, se confirmó por datos ultraestructurales (Figura 8). En ausencia de trombina, los fragmentos tipo plaqueta mostraban una superficie lisa, varios gránulos alfa dispersados en el citoplasma y un sistema canalicular conectado a superficie (SCCS) (Figura 8). Después de la activación con trombina, estas células presentaban cambios morfológicos típicos de plaquetas activadas, concretamente una forma esférica, pseudopodios superficiales, material denso dentro de las cisternas centralizadas y dilatadas de SCCS, sin granulación citoplasmática y un haz central de microfilamentos (Figura 8). Finalmente, para confirmar que los elementos con tamaño de plaqueta se generaban por exposición a corte y no surgían simplemente en suspensión de MK maduros, se compararon los efluentes antes y después de perfusión en la cámara de flujo, por la presencia de núcleos desnudos. El flujo no adherente a través de las células expuestas a corte contenía más núcleos desnudos que células en condiciones estáticas que estaban desprovistas de ellos (datos no mostrados).

Megacariocitos y plaquetas de ratón

La exposición de megacariocitos maduros de ratón a altas velocidades de corte sobre VWF de ratón provocaba una formación eficaz de plaquetas. En una serie de experimentos, la extracción de células derivadas de célula ósea de 6-8 animales permitió la producción de al menos 6-12 x 10^6 megacariocitos maduros. Estas células se expusieron a una velocidad de corte de 1800 s^{-1} durante 90 minutos y se convirtieron completamente en elementos pequeños correspondientes al tamaño de plaqueta. La caracterización de plaquetas de ratón por inmunofluorescencia confocal reveló el anillo de tubulina específico en elementos de tamaño de plaqueta. Las propiedades de agregación en respuesta a agonistas de estas plaquetas se establecen por técnicas convencionales en un agregómetro.

La inyección de plaquetas de acuerdo con la presente descripción a ratones trombocitopénicos rescata el fenotipo hemorrágico

Este experimento está dirigido a rescatar el fenotipo hemorrágico de un ratón receptor trombocitopénico, por infusión de plaquetas de ratón donante generadas por altas fuerzas de corte, como se ha descrito anteriormente.

A los ratones receptores se les inyecta mediante la vena de la cola las plaquetas obtenidas por exposición a corte de megacariocitos maduros de médula ósea obtenidos de ratones donantes combinados. Se obtuvieron ratones trombocitopénicos por administración de bajas concentraciones de un anticuerpo contra-GPIIb-IIIa (Nieswandt et al., 2000). En un experimento típico, se obtuvo una reducción del 80 % de las plaquetas en circulación por 2-3 inyecciones de un anticuerpo anti-GPIIb. Estas plaquetas se marcaron de forma fluorescente antes de inyección al ratón trombocitopénico para estudios de detección y eliminación. Se determina la corrección de recuentos de plaquetas, la hemorragia espontánea y el tiempo de hemorragia en ratones infundidos. Estos fragmentos en circulación son plaquetas activas ya que aumentan las cantidades de plaquetas y corrigen la pérdida de sangre en modelos *in vivo* de hemorragia inducida. Se usó un modelo de dermatitis por contacto irritante que provoca hemorragia masiva limitada al área de inflamación (Goerge et al., 2008). La hemorragia cutánea en ratones trombocitopénicos antes y después de la administración de plaquetas generadas por corte. La función de las plaquetas recién formadas también se evalúa *in vivo* con el modelo de trombosis de lesión por cloruro férrico por microscopia intravital (Denis et al., 1998). Este método proporciona información detallada sobre las diferentes etapas del proceso trombótico, que incluye adhesión de plaquetas individuales, la tasa de crecimiento del trombo, la estabilidad del trombo, el tamaño de los émbolos y el tiempo hasta ocluir el vaso (Denis y Wagner, 2007). Se compara la formación a tiempo real del trombo y la incorporación de plaquetas en el trombo antes y después de la administración de plaquetas en ratones trombocitopénicos.

Conclusión

En conclusión, el hallazgo de que la interacción de MK maduros con VWF en condiciones de flujo promueve la formación de proplaquetas humanas/de ratón representa un avance principal en la comprensión de la formación de plaquetas, que por tanto puede suceder en capilares o arterias pequeñas. La exploración de enfermedades con producción disminuida de plaquetas se beneficiaría enormemente de una mejor comprensión del desprendimiento de plaquetas desde los megacariocitos. Finalmente, los resultados de los inventores proporcionan un método para la producción de plaquetas con fines de diagnóstico o terapéuticos.

Referencias

Ajzenberg, N., A.S. Ribba, G. Rastegar-Lari, D. Meyer, y D. Baruch. 2000. Effect of recombinant von Willebrand factor reproducing type 2B or type 2M mutations on shear-induced platelet aggregation. Blood. 95:3796-803.

Balduini, A., I. Pallotta, A. Malara, P. Lova, A. Pecci, G. Viarengo, C.L. Balduini, y M. Torti. 2008. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. J Thromb Haemost. 6:1900-1907.

Barroga, C.F., H. Pham, y K. Kaushansky. 2008. Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. Experimental Hematology. 36:1585-1592.

Calvete, J.J., A. Henschen, y J. Gonzalez-Rodriguez. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. Biochem J. 274 (Pt 1):63-71.

Conant, C.G., M.A. Schwartz, T. Nevill, y C. Ionescu-Zanetti. 2009. Platelet adhesion and aggregation under flow using microfluidic flow cells. J Vis Exp. 32:1644 [pii].

Cramer, E.M., H. Lu, J.P. Caen, C. Soria, M.C. Berndt, y D. Tenza. 1991. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and Nb-NIa after plasmin stimulation Blood. 77:694-699.

Cramer, E.M., F. Norol, J. Guichard, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, J.-M. Masse, y N. Debili. 1997. Ultrastructure of Platelet Formation by Human Megakaryocytes Cultured With the Mpl Ligand. Blood. 89:2336-2346.

Debili, N., N. Kieffer, M. Nakazawa, J. Guichard, M. Titeux, E. Cramer, J. Breton-Gorius, y W. Vainchenker. 1990. Expression of platelet glycoprotein Ib by cultured human megakaryocytes: ultrastructural localization and biosynthesis. Blood. 76:368-376.

Denis, C., N. Methia, P.S. Frenette, H. Rayburn, M. Ullman-Cullere, R.O. Hynes, y D.D. Wagner. 1998. A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:9524-9529.

Denis, C.V., y D.D. Wagner. 2007. Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27:728-739.

Dopheide, S.M., M.J. Maxwell, y S.P. Jackson. 2002. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. Blood. 99:159-167.

Dunois-Larde, C., C. Capron, S. Fichelson, T. Bauer, E. Cramer-Borde, y D. Baruch. 2009. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. Blood. 114:1875-1883.

Federici, A.B. 2005. Management of von Willebrand disease with factor VIII/von Willebrand factor concentrates: results from current studies and surveys. Blood Coagul Fibrinolysis. 16 Suppl 1:S17-21.

Fichelson, S., J.-M. Freyssinier, F. Picard, M. Fontenay-Roupie, M. Guesnu, M. Cherai, S. Gisselbrecht, y F. Porteu. 1999. Megakaryocyte Growth and Development Factor-Induced Proliferation and Differentiation Are Regulated by the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Primitive Cord Blood Hematopoietic Progenitors. Blood. 94:1601-1613.

Fujimura, Y., K. Titani, L.Z. Holland, S.R. Russell, J.R. Roberts, J.H. Elder, Z.M. Ruggeri, y T.S. Zimmerman. 1986. von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. 261:381-385.

Girma, J.P., M.W. Chopek, K. Titani, y E.W. Davie. 1986a. Limited proteolysis of human von Willebrand factor by Staphylococcus aureus V-8 protease: isolation and partial characterization of a platelet-binding domain. Biochemistry. 25:3156-63.
Girma, J.P., M. Kalafatis, G. Pietu, J.M. Lavergne, M.W. Chopek, T.S. Edgington, y D. Meyer. 1986b. Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. Blood. 67:1356-66.
Goerge, T., B. Ho-Tin-Noe, C. Carbo, C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, B.-Q. Zhao, S.M. Cifuni, y D.D. Wagner. 2008. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. Blood. 111:4958-4964.
Goudemand, J., I. Scharrer, E. Berntorp, C.A. Lee, A. Borel-Derlon, N. Stieltjes, C. Caron, J.M. Scherrmann, F. Bridey, Z. Tellier, A.B. Federici, y P.M. Mannucci. 2005. Pharmacokinetic studies on Wilfactin, a von Willebrand factor concentrate with a low factor VIII content treated with three virus-inactivation/removal methods. J Thromb Haemost. 3:2219-2227.
Greenberg, S.M., D.S. Rosenthal, T.A. Greeley, R. Tantravahi, y R.I. Handin. 1988. Characterization of a new megakaryocytic cell line: the Dami cell. Blood. 72:1968-1977.
Houdijk, W.P., M.E. Schiphorst, y J.J. Sixma. 1986. Identification of functional domains on von Willebrand factor by binding of tryptic fragments to collagen and to platelets in the presence of ristocetin. Blood. 67:1498-1503.
Huizinga, E.G., S. Tsuji, R.A. Romijn, M.E. Schiphorst, P.G. de Groot, J.J. Sixma, y P. Gros. 2002. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. Science. 297:1176-9.
Isakari, Y., S. Sogo, T. Ishida, T. Kawakami, T. Ono, T. Taki, y H. Kiwada. 2009. Gene Expression Analysis during Platelet-Like Particle Production in Phorbol Myristate Acetate-Treated MEG-01 Cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 32:354-358.
Italiano, J.E., Jr., W. Bergmeier, S. Tiwari, H. Falet, J.H. Hartwig, K.M. Hoffmeister, P. Andre, D.D. Wagner, y R.A. Shivdasani. 2003. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. Blood. 101:4789-4796.
Italiano, J.E., Jr., P. Lecine, R.A. Shivdasani, y J.H. Hartwig. 1999. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. J Cell Biol. 147:1299-1312.
Kauskot, A., F. Adam, A. Mazharian, N. Ajzenberg, E. Berrou, A. Bonnefoy, J.-P. Rosa, M.F. Hoylaerts, y M. Bryckaert. 2007. Involvement of the Mitogenactivated Protein Kinase c-Jun NH2-terminal Kinase 1 in Thrombus Formation. J Biol Chem. 282:31990-31999.
Legendre, P., A. Salsmann, J. Rayes, O. Trassard, N. Kieffer, y D. Baruch. 2006. CHO cells expressing the high affinity alphaIIbbeta3T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. J Thromb Haemost. 4:236-246.
Marx, I., O.D. Christophe, P.J. Lenting, A. Rupin, M.-O. Vallez, T.J. Verbeuren, y C.V. Denis. 2008. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIbIIIa. Blood. 112:603-609.
Mazharian, A., S. Roger, E. Berrou, F. Adam, A. Kauskot, P. Nurden, M. Jandrot-Perrus, y M. Bryckaert. 2007. Protease-activating Receptor-4 Induces Full Platelet Spreading on a Fibrinogen Matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca2+ mobilization. J. Biol. Chem. 282:5478-5487.
Mekrache, M., N. Kieffer, y D. Baruch. 2002. Activation of recombinant [alpha]IIb[beta]3 expressed in Chinese hamster ovary cells exposes different binding sites for fibrinogen or von Willebrand factor: evidence using monoclonal antibodies to [alpha]IIb[beta]3. Br J Haematol. 116:636-644.
Miura, S., C.Q. Li, Z. Cao, H. Wang, M.R. Wardell, y J.E. Sadler. 2000. Interaction of von Willebrand Factor domain A1 with platelet glycoprotein Ibalpha-(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. J Biol Chem. 275:7539-7546.
Nieswandt, B., W. Bergmeier, K. Rackebrandt, J.E. Gessner, y H. Zirngibl. 2000. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. Blood. 96:2520-2527.
Norol, F., N. Vitrat, E. Cramer, J. Guichard, S.A. Burstein, W. Vainchenker, y N. Debili. 1998. Effects of Cytokines on Platelet Production From Blood and Marrow CD34+ Cells. Blood. 91:830-843. Nurden, A.T. 2005. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. J Thromb Haemost. 3:1773-1782.
Pai, M., y C.P. Hayward. 2009. Diagnostic assessment of platelet disorders: what are the challenges to standardization? Semin Thromb Hemost. 35:131-8.
Patel, S.R., J.H. Hartwig, y J.E. Italiano, Jr. 2005a. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J. Clin. Invest. 115:3348-3354.
Patel, S.R., J.L. Richardson, H. Schulze, E. Kahle, N. Galjart, K. Drabek, R.A. Shivdasani, J.H. Hartwig, y J.E. Italiano, Jr. 2005b. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. Blood. 106:4076-4085.
Pedersen, N.T. 1978. Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. Scand J Haematol. 21:369-75.
Richardson, J.L., R.A. Shivdasani, C. Boers, J.H. Hartwig, y J.E. Italiano, Jr. 2005. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. Blood. 106:4066-4075.
Robinson, A.J., D. Kashanin, F. O'Dowd, V. Williams, y G.M. Walsh. 2008. Montelukast inhibition of resting and GM-CSF-stimulated eosinophil adhesion to VCAM-1 under flow conditions appears independent of cysLT(1)R antagonism. J Leukoc Biol. 83:1522-9.
Rondaij, M.G., R. Bierings, A. Kragt, J.A. van Mourik, y J. Voorberg. 2006. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26:1002-1007.
Ruggeri, Z.M. 2003. von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J Thromb Haemost. 1:1335-42.

Tavassoli, M., y M. Aoki. 1981. Migration of entire megakaryocytes through the marrow--blood barrier. Br J Haematol. 48:25-9.
Williams, V., D. Kashanin, I.V. Shvets, S. Mitchell, Y. Volkov, y D. Kelleher. 2002. Microfluidic Enabling Platform for Cell-based Assays. Journal of the Association for Laboratory Automation. 7:135-141.2

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para producir plaquetas, que comprende la etapa de someter una suspensión de megacariocitos maduros a un flujo que permite una exposición a una velocidad de corte apropiada para la generación de plaquetas y en una fase sólida recubierta con factor de von Willebrand (VWF), o con un fragmento o variante o análogo del mismo, que se une a GPIb.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fragmento o variante o análogo de VWF se selecciona del grupo que consiste en fragmento tríptico de 52/48 kDa de VWF; VWF digerido con proteasa V-8 de *Staphylococcus aureus*; concentrados de VWF para uso terapéutico y mutantes de VWF responsables de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichos megacariocitos maduros se exponen a una velocidad de corte de al menos 1000 s^{-1}.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha concentración celular en el cultivo está comprendida entre 0,5 y 4 x 10^6/ml o es de al menos 4 x 10^6/ml.

5. Un método para promover la formación de proplaquetas, que comprende someter los megacariocitos maduros en condiciones de flujo en presencia de fuerzas de corte en una cámara de flujo en el que la cámara de flujo comprende una pared inferior recubierta con VWF.

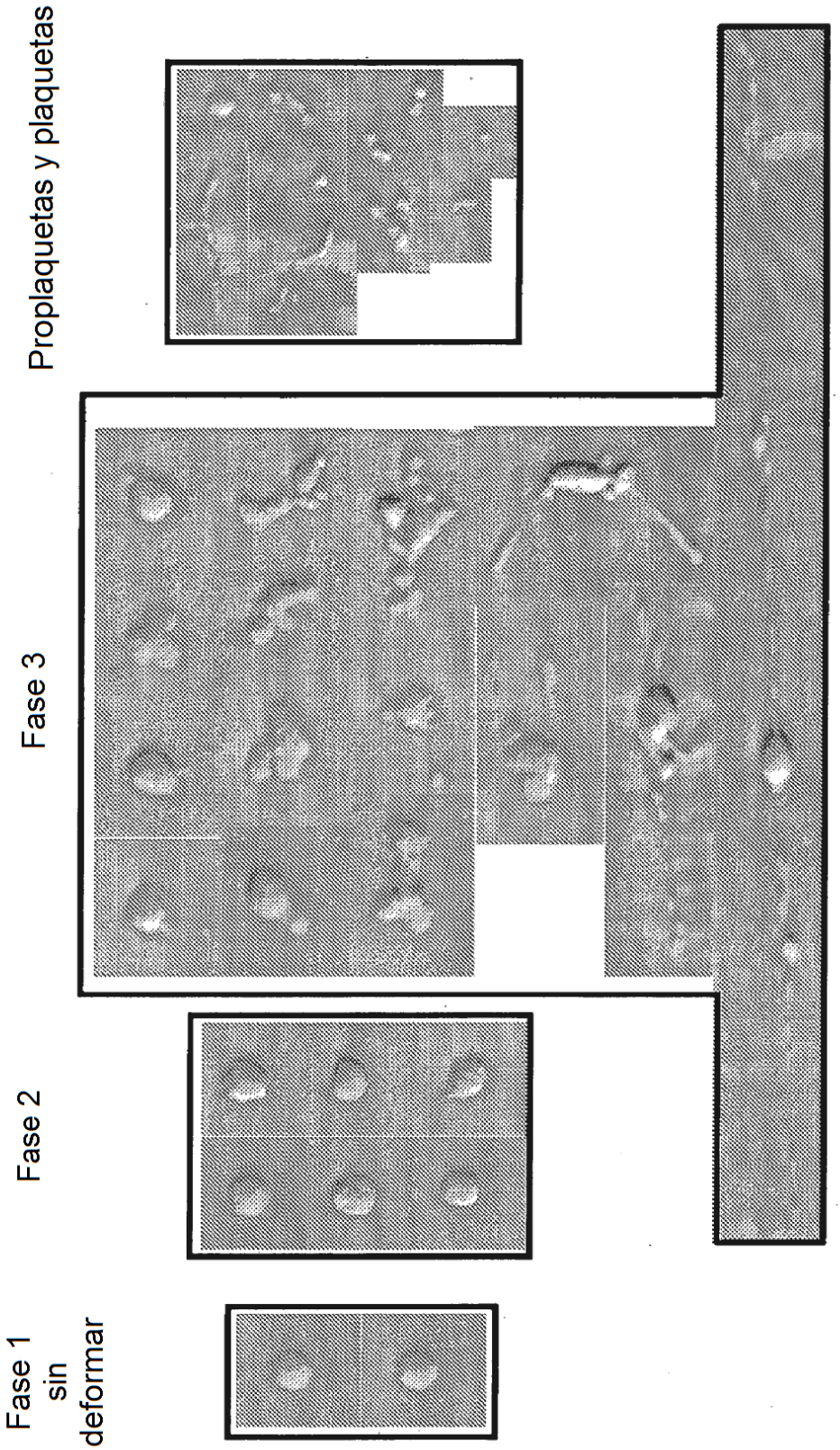

Figura 1A

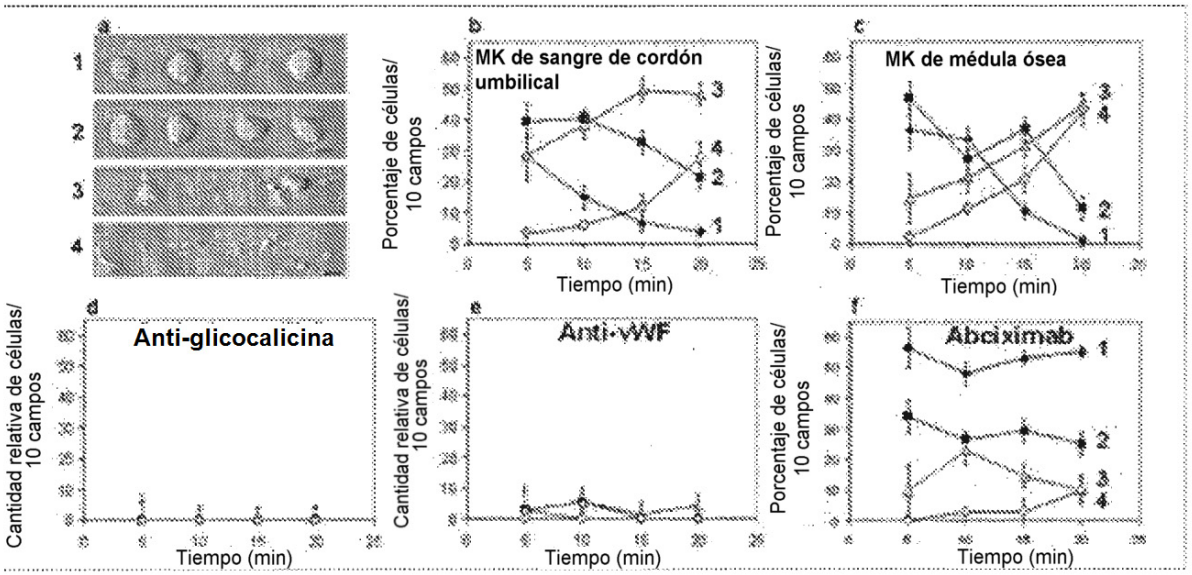

Figura 1b

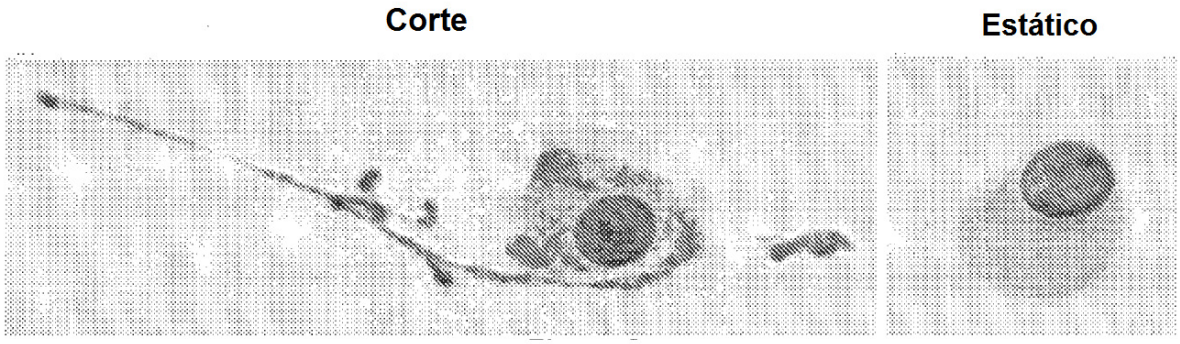

Figura 2

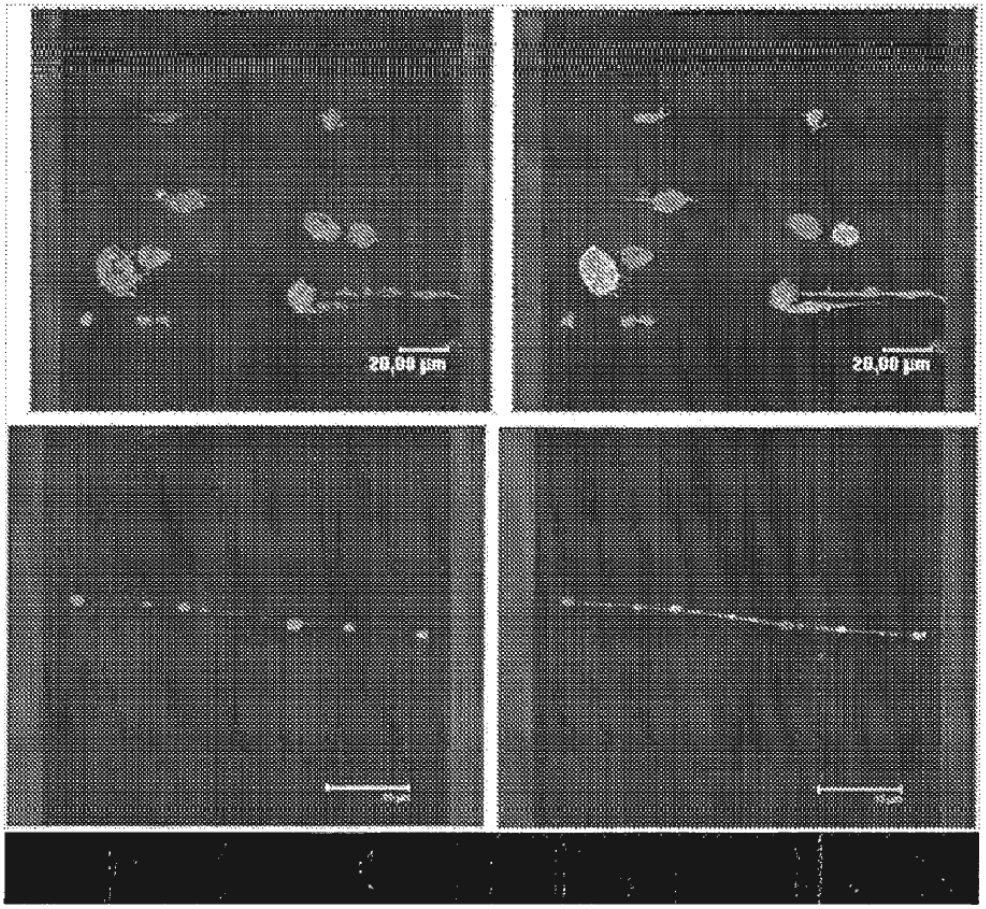

Figura 3A

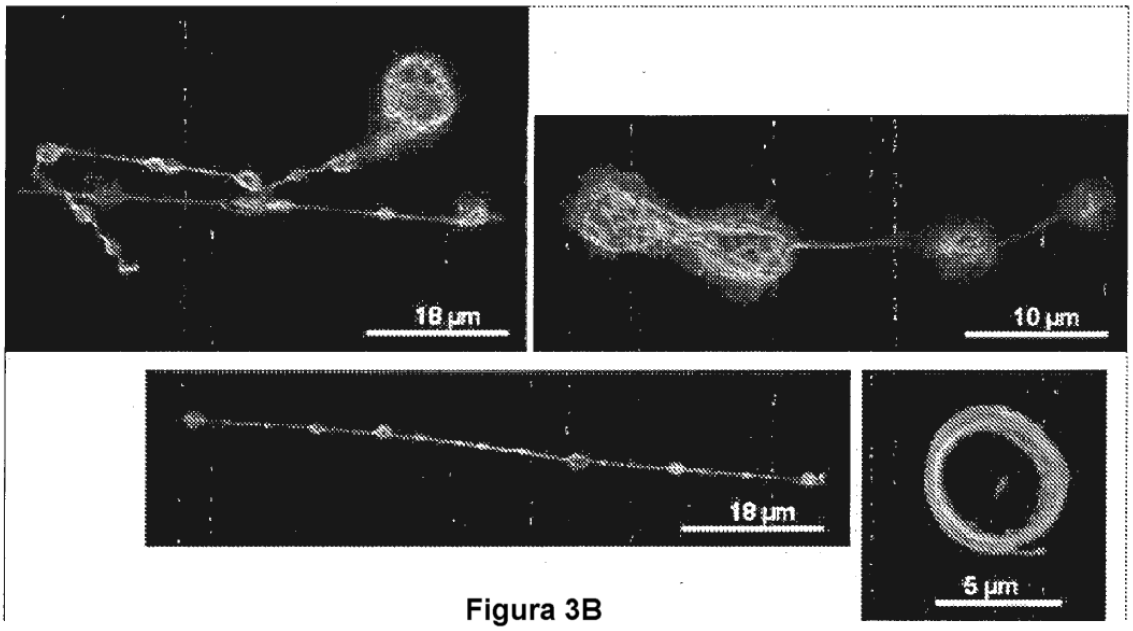

Figura 3B

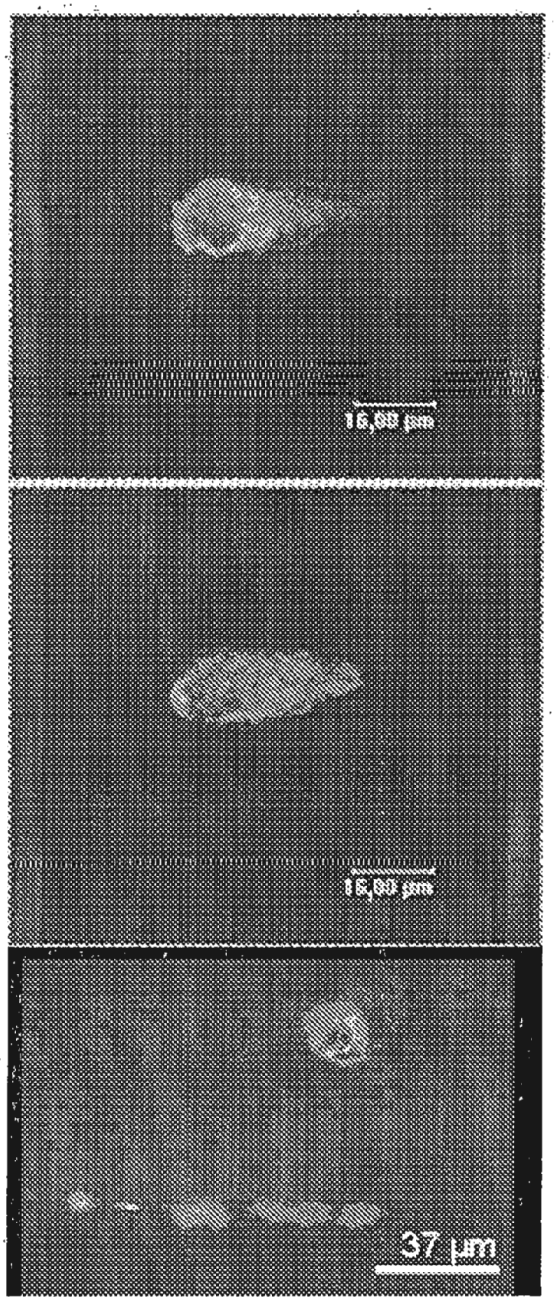

Figura 3C

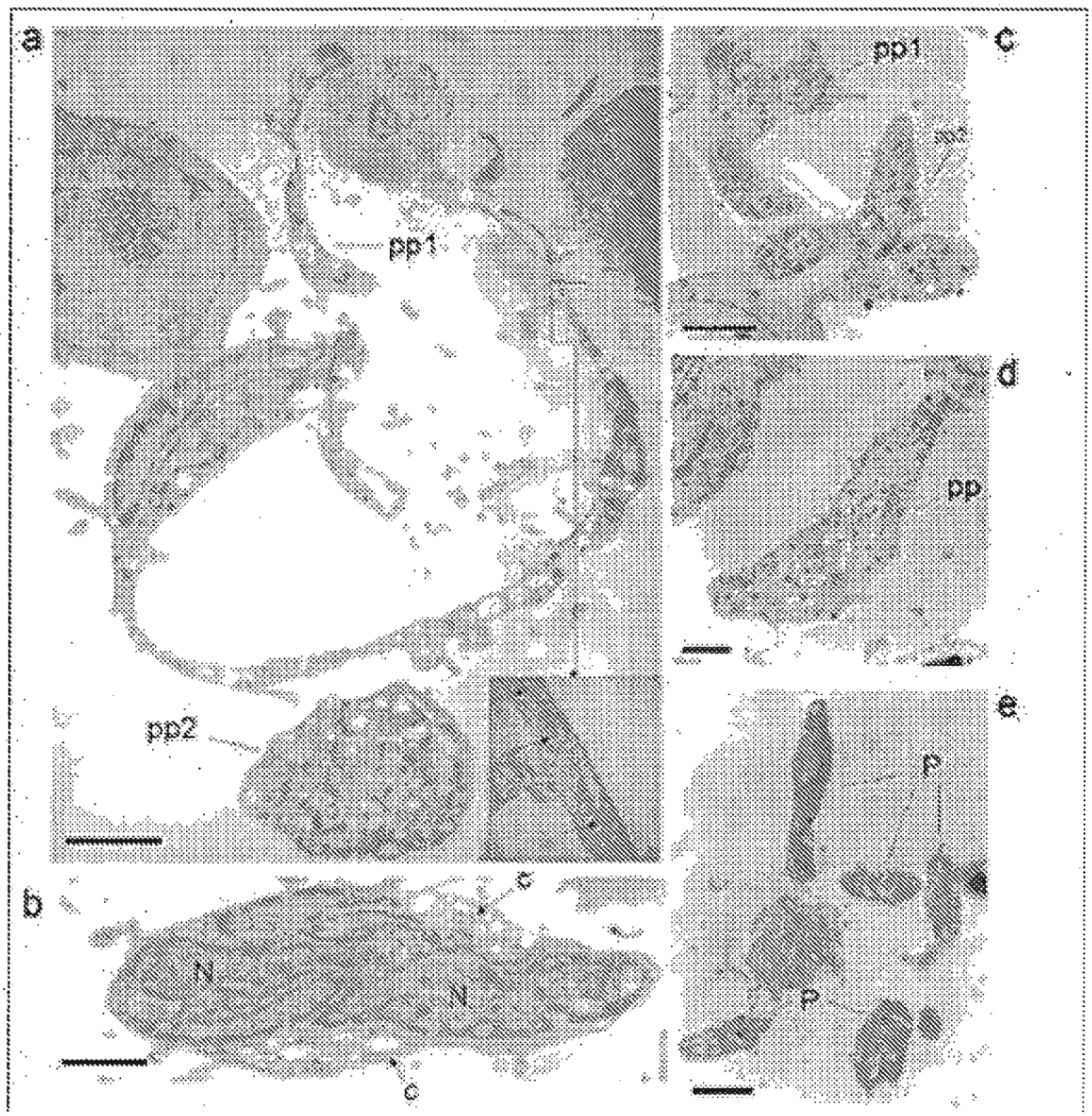

Figura 4

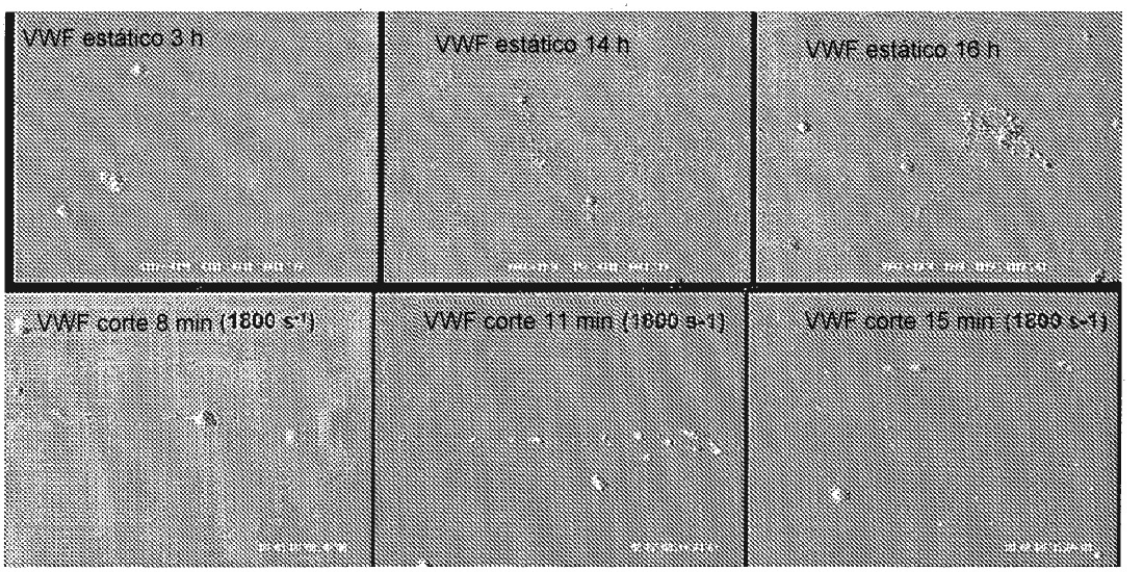

Figura 5A

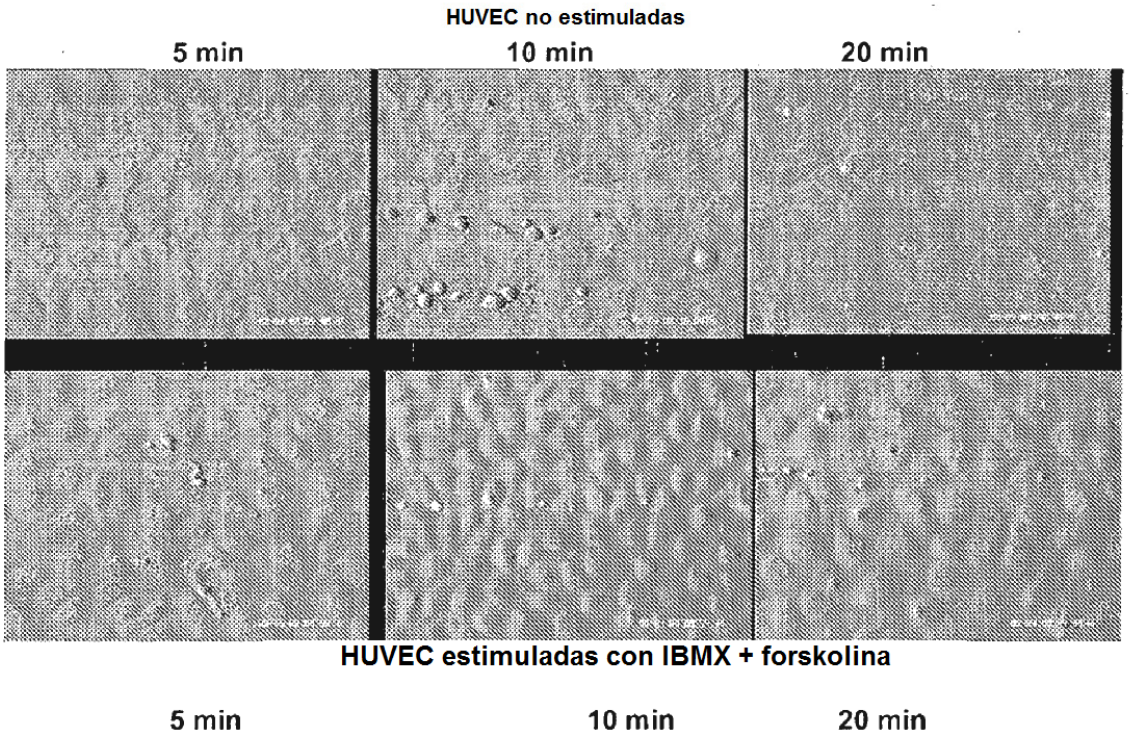

Figura 5B

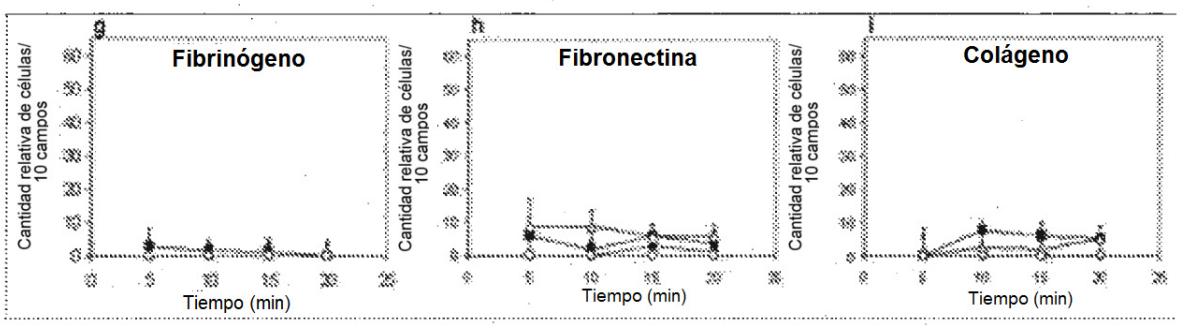

Figura 5C

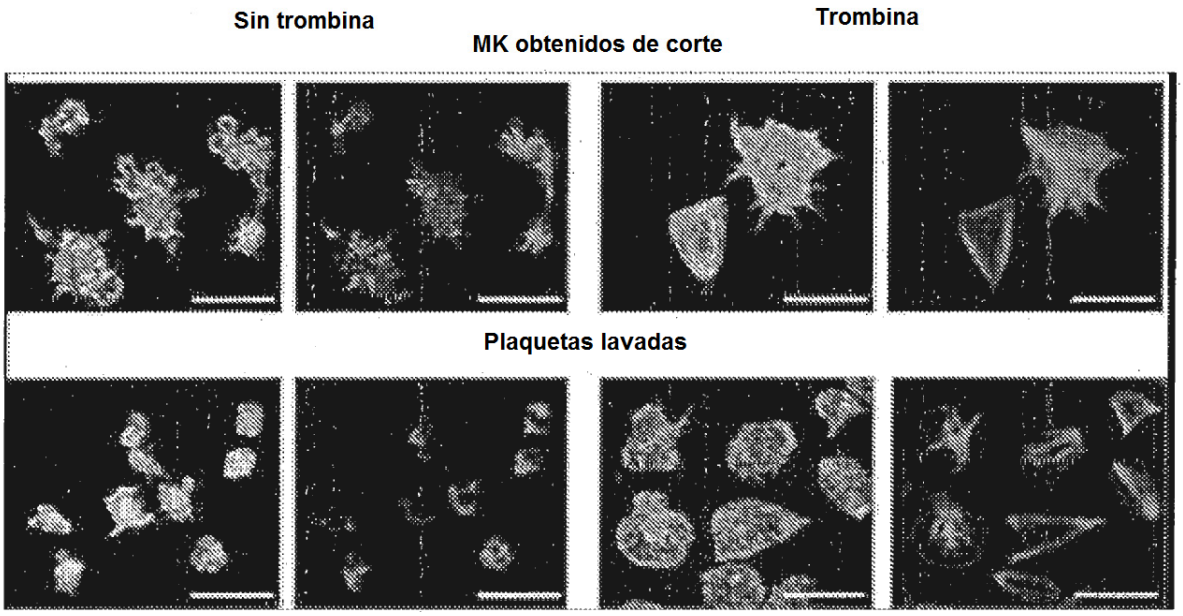

Figura 6

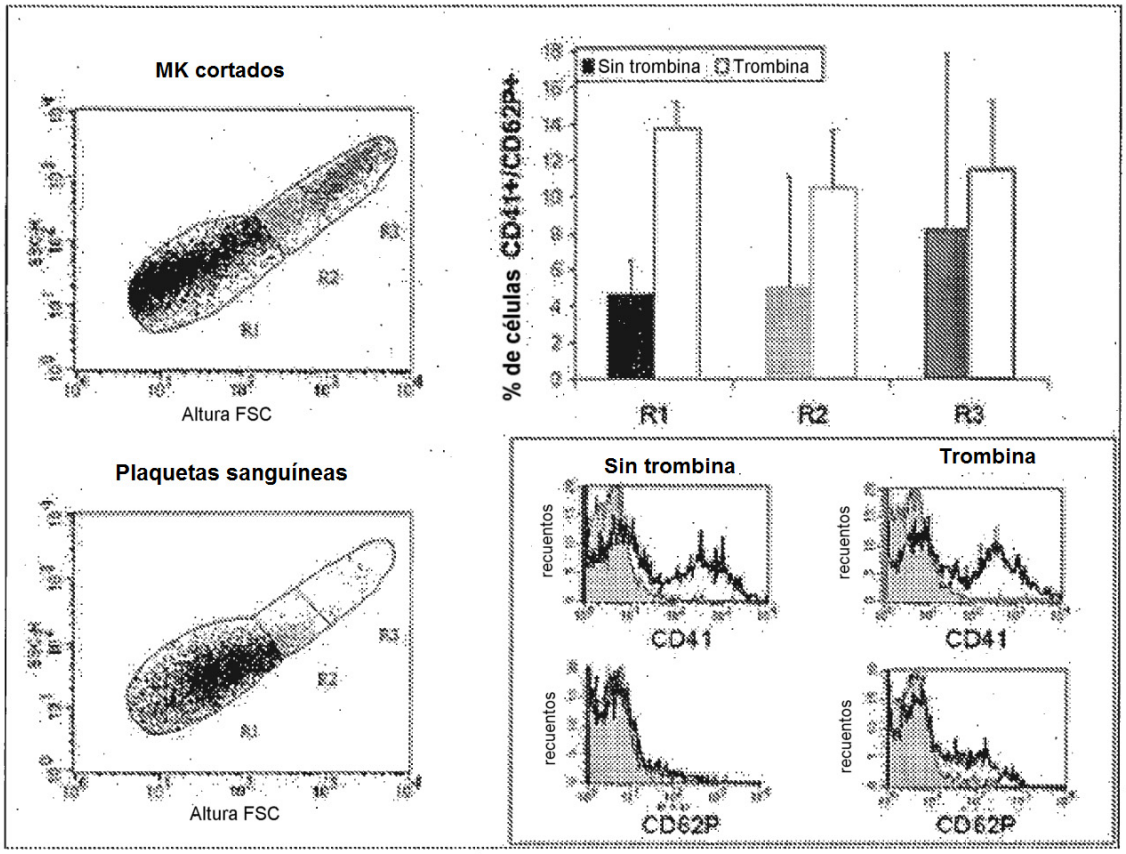
MK cortados
Altura FSC
Plaquetas sanguíneas
Altura FSC
Sin trombina
Trombina
% de células CD41+/CD62P+
R1
R2
R3
Sin trombina
Trombina
recuentos
CD41
CD62P

Figura 7

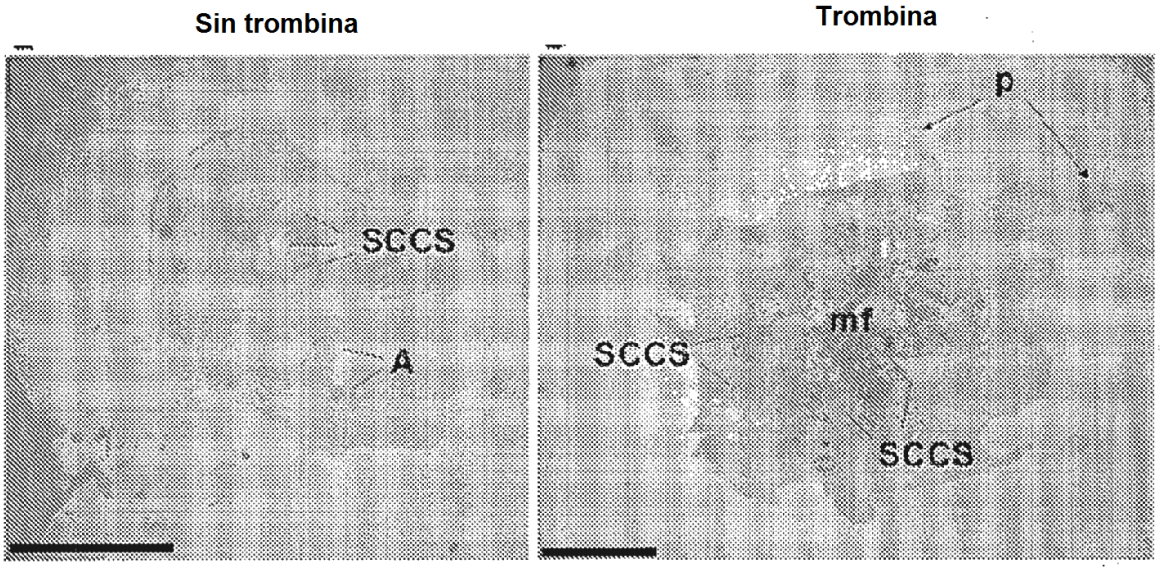

Figura 8