

## MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES Y COAGULACIÓN. SU ASOCIACIÓN CON DIVERSAS PATOLOGÍAS.

Dra. Norma de Bosch<sup>1</sup> e Irene Bosch<sup>2</sup>  
Universidad Central de Venezuela <sup>1</sup>  
Facultad de Medicina  
Postgrado de Hematología. Banco Municipal de Sangre  
Caracas. Venezuela  
MIT, Boston, USA. <sup>2</sup>

Las Micropartículas (MP) celulares constituyen una heterogénea población de vesículas menores de 1µm, generadas de la membrana plasmática celular ante una activación o proceso apoptótico. Los estudios con marcadores celulares demuestran que las micropartículas pueden derivar de leucocitos, eritrocitos, células endoteliales, células cancerosas, del sistema nervioso central, de adipocitos. En base a dichos datos, podríamos plantear la posibilidad de que todas las células eucariotas puedan generar micropartículas ante un estímulo o apoptosis y mantener a través de ellas un mecanismo de comunicación intercelular. Las MP conservan los epítopes característicos de las células que les dan origen y su presencia y distribución en personas normales está bien documentada. La proporción de MP derivadas de las distintas células varía en diversos estados patológicos, de allí el interés de su estudio, tanto del punto de vista fisiológico como patogénico.

Las MPs exponen fosfatidil serina en su membrana y cuando se agrupan según sus tamaños (todos <1 µm), muestran un contenido proteico (factores de crecimiento, receptores, quimoquinas, etc.) diferente y según su escala de tamaño. Las MP derivadas de plaquetas son las que constituyen al menos las 2 terceras partes de las MP del plasma. Se consideran MP derivadas de plaquetas (MPP) aquellas que se marcan con anticuerpos anti-CD 41 o CD 42b. Estas MPP pueden provenir de las propias plaquetas circulantes o de los megacariocitos. El incremento de las MPP CD41+ se observa *in vitro* cuando las plaquetas son activadas por trombina o por ionóforo de Ca<sup>++</sup>. También se observa en concentrados plaquetarios envejecidos, en la exposición a complemento, en la circulación plaquetaria ante la fuerza de cizallamiento en vasos estrechos, o durante la apoptosis. Las micropartículas de plaquetas marcan también para el CD62p de la membrana granular intraplaquetaria que se está expresando en estas condiciones de activación o apoptosis. Las MP de origen megacariocítico son las que más abundan en el plasma normal y difieren de las plaquetarias porque no expresan el CD 62p.

### MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LAS MPP

El conocimiento de los mecanismos que condicionan la aparición y aumento de las MPs son importantes para entender su papel tanto en condiciones normales como en la enfermedad. La pérdida de la simetría de la membrana celular, por la traslocación y exposición de la fosfatidil serina, trae como consecuencia una pérdida de la adhesión del citoesqueleto a la membrana y contribuye a la separación de las MPS. Al mismo tiempo, hay una movilización del Ca<sup>++</sup> intracelular, que contribuye a la exposición de la fosfatidil serina. Se ha observado en las plaquetas, que la inhibición del CD42b disminuye la vesiculización producida por la fuerza de cizallamiento de la pared vascular.

La cantidad de MPP circulantes es mayor en mujeres que en hombres. Depende del balance entre los estímulos de producción y de eliminación. La vida media de las MPP circulantes es de unos 30 minutos en ratones (12) y su mecanismo de desaparición no es muy bien conocido: se implica a la fagocitosis, a la acción de fosfolipasas y finalmente, a secuestro por el bazo.

### MÉTODOS DE ESTUDIO DE MPP

La estandarización de los métodos de determinación cuantitativa y caracterización de las MP están siendo evaluados a través del subcomité respectivo de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, ISTH ([www.isth.org](http://www.isth.org)). Los niveles normales de las MPP circulantes varían en las distintas

publicaciones. Hay variables pre-analíticas que afectan los resultados finales. Los protocolos de centrifugación son muy importantes, pues pueden generar MPP por procesamiento. Los métodos de preparación del plasma pobre en plaquetas (PPP) con una sola centrifugación y de plasma con doble centrifugación (plasma libre de plaquetas: PFP) varía, entre los distintos autores, al igual que el anticoagulante utilizado. La reciente revisión sobre los métodos de análisis de MPs publicada por Yuana Y, Bertina R y Osanto S, citan los distintos métodos de preparación de MPS, publicados por 12 diferentes investigadores. En ese mismo trabajo podemos observar, cómo el número de MPP encontrado en personas normales, llegan a variar entre  $570 \times 10^6$  y  $1,775 \times 10^6/L$  según las condiciones de velocidad, tiempo y temperatura de centrifugación del plasma pobre en plaquetas.

La identificación y cuantificación de las MPP se realiza generalmente por **citometría de flujo**, en base al tamaño y/o la fluorescencia de las MP. Se usan como patrón perlas calibradas de diferentes diámetros (0,5, 0,9 y 3  $\mu m$ ). La proveniencia de las MP se identifica con anticuerpos fluorescentes específicos de las células madres de las MP respectivas. El plasma PPP o PFP también se puede ultracentrifugar para obtener un paquete de MPs, que se lavan y resuspenden en soluciones tamponadas, lo que permite una concentración mayor para su estudio.

Otras metodologías que se aplican para el estudio de las MP son: **Métodos de captura**: se capturan las MPP en una placa en la cual se ha fijado anexina V generalmente, y luego revelan con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (ELISA) o se analizan en cuanto a su capacidad funcional procoagulante, con sustratos cromogénicos. Es posible que la cuantificación por ELISA o por citometría no se correlacione con los resultados funcionales, los cuales parecen ser un mejor reflejo de la patofisiología de las MPP(30).

La anexina V puede captar otras MP. Por ello, Nomura et al han usado CD42a para la captura y CD42b como segundo anticuerpo, que son marcadores propios de plaquetas. Existen estuches comerciales de American Diagnostica, USA (Actichrom AD) y de Hyphen Biomed, Francia (Zymuphen), que utilizan estos métodos de captura. Las MPP aisladas y concentradas se han medido por su expresión de Factor Tisular, aunque no existe todavía un patrón disponible para Factor Tisular

**Microscopía electrónica**, utiliza anticuerpos unidos a oro para la identificación de la MP.

**Microscopía confocal con laser** que permite detectar las MP a través de la expresión de diversos antígenos, como las glicoproteínas de membrana, la trombospondina, etc. Mediante este método se han podido identificar en las MP, coexpresiones de antígenos diferentes, como el CD/61 que pertenece a las plaquetas, con antígenos de carcinoma de mama, en un caso de metástasis de dicho carcinoma, lo que nos habla de la fusión e interacción de las MPs entre si. Los métodos ópticos no cuantifican las MP, pero visualizan y comparan e identifican las diferentes MP en la preparación.

**Proteómico**: El estudio del contenido proteico de las MPPs, estimuladas o no (p-selectina, GPIIb/IIIa, RANTES, Fbg, FVW, FV, FXIII, FVII, inmunoglobulinas, contenido de los gránulos a) permite identificarlas y conocer su comportamiento.

#### **Funciones de las Micropartículas**

Las MPs son procoagulantes, por la exteorización de la fosfatidilserina, situada normalmente en la región citoplasmática de la membrana celular. La superficie de fosfatidilserina resulta así 50 a 100 veces mayor que la que ocupan las plaquetas circulantes y sirven de asiento a los factores de coagulación al mismo tiempo que cataliza su activación para los procesos que conducen a la formación del coágulo de fibrina. Otra propiedad protrombótica de las MP obedece a la frecuente expresión de Factor tisular (FT) en las MP. Se piensa que el FT de las MP, originadas en las balsas lipídicas, ricas en colesterol, de las membranas de monocitos y macrófagos, pueden contribuir a iniciar fisiológicamente la coagulación y contribuir a la hemostasia normal, especialmente en los pequeños vasos. Evidencias mayores existen para involucrar a las MP en la patogenia de la Trombosis. Estas evidencias provienen de estudios en modelos animales de trombosis y de observaciones clínicas.

Los estudios en trombosis experimental señalan que hay un reclutamiento de MP de las células hemáticas circulantes ricas en FT, en los sitios de trombosis por lesión carotídea o por efecto de rayos laser en la microcirculación. Igualmente, se han encontrado elevadas MP ricas en FT en tumores malignos y en hiperlipidemia de ratones.

Hay otras funciones de las MP, como la interacción célula a célula (ejemp.: células endoteliales/células sanguíneas), mediante el transporte de moléculas bioactivas y señales diversas. Se sabe que las MP pueden activar ligandos o transferir receptores, como se observa en el traslado de CD41 a células

hemátopoyéticas, lo que aumenta la afinidad de estas últimas por el Fng. También inician la apoptosis en los macrófagos, trasladan RNA e inducen la angiogénesis en las células endoteliales, activan los neutrófilos y sus moléculas de adhesión, modulan la inmunidad alterando la síntesis de inmunoglobulinas y la actividad linfocitaria .

Nosotros hemos estudiado experimentalmente el comportamiento de las micropartículas derivadas de células mononucleares sanguíneas infectadas con virus, específicamente virus de Dengue 3 y Dengue 2 , y hemos comprobado que portan partículas virales, que la infección induce cambios en el contenido proteico y aumento en la adhesión a células endoteliales. Las MPs provenientes de las células infectadas con el virus provocan en las células endoteliales la expresión de genes, que se identifican con una respuesta proinflamatoria.

## **MICROPARTÍCULAS PLAQUETARIAS Y ENFERMEDAD**

### **1. –En la enfermedad arterial :**

Se ha observado que las MPP son capaces de generar trombina, aun en individuos normales (25) y esta actividad procoagulante se asocia a la formación de tromboxano A<sub>2</sub> cuando se exponen a fosfolipasa A<sub>2</sub> . Por esta propiedad, se considera que las MPP contribuyen a la patogenia de la enfermedad tromboembólica arterial y su número circulante tiene un valor predictor de eventos trombóticos. En relación a trombosis venosas, hay datos experimentales y un aumento importante se ha observado en el embolismo pulmonar. Se ha constatado un aumento de la P-selectina y de las MPP en el infarto del miocardio y en la enfermedad arterial, lo que refleja un incremento de la actividad plaquetaria en estos casos, pero no se demostraron diferencias cuantitativas entre el IM y la angina inestable, en cambio sí aumentan significativamente las MP endoteliales en el IM. En el infarto agudo del miocardio (IAM) el aumento de las MPP circulantes se correlaciona con el aumento del complejo trombina/antitrombina. También su número se correlaciona con el ancho de la túnica media carotídea en los casos de enfermedad arterial carotídea. En los eventos cerebrovasculares las MPP se han encontrado aumentadas y su grado de aumento se ha asociado a la severidad del accidente adverso.

Por otra parte, en los defectos congénitos de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria, como ocurre en el síndrome de Scott, hay deficiente formación de MPP y tendencia al sangramiento .

### **2.- En cáncer y sus metástasis:**

Las MPP están envueltas en las metástasis del cáncer y su capacidad de promover neovascularización (Además, los tumores pueden activar a las plaquetas y producir un aumento de MPP. También se ha observado en casos de cáncer una mayor expresión de Factor Tisular, que junto a la actividad procoagulante de las MPP circulantes debido a su capa de fosfatidilserina y a receptores de factores activados de coagulación, contribuyen al desarrollo de trombosis, que es una manifestación 4 a 5 veces más frecuente en las enfermedades malignas que en personas sanas. Además de las MP de origen plaquetario, se pueden producir MPs de las propias células tumorales, aumentando así su crecimiento *in situ*, como ocurre en los gliomas y en varios tipos de cáncer se han descrito un aumento de MPs circulantes. Se considera que MPs tienen un papel en la supervivencia de las células tumorales, en su capacidad invasiva y en las metástasis, a través de diferentes mecanismos , entre los cuales mencionan el evitar su detección por el sistema inmune y en el crecimiento tumoral en general .

### **3.- MPP e infecciones:**

Las MP plaquetarias pueden transferir correceptores a células receptoras , favoreciendo así la infección celular, como por ejemplo en VIH-1, en la que se considera que contribuyen a la diseminación del virus . Nosotros hemos podido observar partículas virales en las MP derivadas de mononucleares sanguíneos, después de la infección *in vitro* por el virus del dengue (Journal of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2007, Vol 77, #5, abs. )

### **4.- MPP e inflamación:**

En la artritis reumatoide, Boilard et al. demostraron que las MPP amplificaban la inflamación articular. En el líquido sinovial de las articulaciones inflamadas encuentran MPP, que pueden activar a los fibroblastos capsulares, haciendo que segreguen citoquinas inflamatorias que contribuyen a las manifestaciones de esta patología.

Revisiones de D Smalley K ley(2008),J E Italiano(2010), Varon D y Shai E(2009) y S Zahra (2011) nos ilustran y proveen bibliografía importante sobre la relación de MPP y enfermedad.

**5.- Infección por virus:** en nuestros estudios en pacientes con infección por virus del dengue hemos preparado MPs del plasma, en las que predominan las MP de monocitos, y que añadidas a un plasma normal citratado y recalcificado, en un estudio tromboelatógráfico, activan la coagulación en forma dosis dependiente, similar a las MP de origen plaquetario que predominan de un plasma control normal.

#### Referencias :

- 1: Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967 ;13(3):269-88.
- 2: Freyssinet JM, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res.* 2010 ;125 Suppl 1:S46-8.
- 3: Siljander PR. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res.* 2011;127 Suppl 2:S30-3.
- 4: Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Birnbaumer E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004 ;2(10):1842-51.
- 5: Flaumenhaft R, Mairuhu AT, Italiano JE. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 2010 ;36(8):881-7.
- 6: Rank A, Nieuwland R, Delker R, Köhler A, Toth B, Pihusch V, Wilkowski R, Pihusch R. Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo. *Thromb Res.* 2010 ;126(4): 255-9.
- 7: Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(1):15-26.
- 8: Arachiche A, Kerbiriou-Nabias D, Garcin I, Letellier T, Dachary-Prigent J. Rapid procoagulant phosphatidylserine exposure relies on high cytosolic calcium rather than on mitochondrial depolarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(11):1883-9.
- 9: Dale GL, Remenyi G, Friese P. Tetraspanin CD9 is required for microparticle release from coated-platelets. *Platelets.* 2009 ;20(6):361-6.
- 10: Siljander P, Farndale RW, Feijge MA, Comfurius P, Kos S, Bevers EM, Heemskerk JW. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: Involvement of p38 MAP kinase and calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):618-27.
- 11: Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, Friese K, Thaler CJ. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. *Platelets.* 2007;18(7):515-21.

- 12: Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009; 101(3):439-51.
- 13: Yi Wu, Nitu Tibrewal and Raymond B. Birge Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill  
*Trends in Cell Biology*, Volume 16, Issue 4, 189-197, 1 April 2006
- 13: Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17(6):578-84.
- 14: Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood.* 2009;113(6):1332-9.
- 15: Zahra S, Anderson JA, Stirling D, Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br J Haematol.* 2011; 152(8):688-700
- 16: Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):396-408.
- 17: Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, Ferry B. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability within the assay. *Thromb Res.* 2011; 127(4):370-7.
- 18: Dale GL, Remenyi G, Friese P. Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3(9):2081-8. .
- 19: Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, Uchiyama S, Ikeda Y. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(6):878-87.
- 20: Smalley DM, Ley K. Plasma-derived microparticles for biomarker discovery. *Clin Lab.* 2008;54(3-4):67-79.
- 21: Olivier Morel, Nicolas Morel, Jean-Marie Freyssinet and Florence Toti. Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses  
*Platelets.* 2008; 19, (1 ): 9-23.
- 22: Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17(6):578-84.
- 23: Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004;11(3):156-64.
- 24: Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J*

Thromb Haemost. 2010;8(11):2358-68.

25: Berckmans RJ, Nieuwland R, Buijning AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):639-46.

26: Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2118-2

27: Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol.* 1997 Mar;96(3):458-63.

28: Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):30-8.

29: Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res.* 2008;122(5):604-9.

30: Varon D, Shai E. Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. *Discov Med.* 2009;8(43):237-41.

31: Thaler J, Ay C, Weinstabl H, Dunkler D, Simanek R, Vormittag R, Freyssinet JM, Zielinski C, Pabinger I. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann Hematol.* 2011;90(4):447-53.

32: Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.* 2010;327(5965):580-3.