

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTAD DE MEDICINA**

*TESIS DOCTORAL*

**ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN  
LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

*MÓNICA MARTÍN SALCES*

*2016*



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN  
LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

Tesis presentada por **MÓNICA MARTÍN SALCES** para optar al grado de Doctor por  
la Universidad Autónoma de Madrid

**DIRECTORES DE TESIS:**

*DRA. NORA BUTTA COLL*

*DRA. RAQUEL DE PAZ ARIAS*

*DR. VÍCTOR JIMÉNEZ YUSTE*

*Madrid, 2016*



La Dra. Nora Butta Coll, investigadora del Instituto para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, la Dra. Raquel de Paz Arias, Médico Adjunto del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ y el Dr. Víctor Jiménez Yuste, Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que **MÓNICA MARTÍN SALCES** ha realizado bajo su dirección el trabajo “ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS”.

Este trabajo reúne el interés y condiciones suficientes para considerarlo apto para su presentación como tesis doctoral en el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente escrito en Madrid a 1 de Septiembre de 2016.

Fdo.: Dra. Nora Butta Coll

Fdo.: Dra. Raquel de Paz Arias

Fdo.: Dr. Víctor Jiménez Yuste



*A mis padres, Felipe y Rosario*

*A mis hermanos, Roberto, Raúl y Antonio por estar siempre ahí*

*A mis sobrinos, Adrián y Álvaro, por ser capaces, aún sin saberlo,  
de alegrarme siempre el corazón*





# Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Nora Butta Coll su constante ayuda para la realización de esta tesis. Sin su orientación, apoyo y buena disponibilidad este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Víctor Jiménez Yuste por haberme introducido y contagiado su entusiasmo en el mundo de la hemostasia. Gracias por haber confiado en mí y por tu ayuda diaria y no sólo en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Raquel de Paz Arias, pilar fundamental en la inclusión de los pacientes en el estudio y maestra en el campo de los síndromes mielodisplásicos. Gracias por tu cariño, confianza y apoyo durante todos estos años.

A mis padres, que lo dan todo sin pedir nada a cambio.

A mis hermanos por su apoyo constante, su paciencia y por no fallarme nunca. A mi hermano Raúl, la persona decisiva en la última fase de esta tesis. Gracias por ayudarme a darla forma.

A mis sobrinos, simplemente por ser como sois. Gracias por animarme con vuestra sola presencia.

A mi prima Rosa M<sup>a</sup>, ejemplo de trabajo en investigación, por su recuerdo constante en “¿cómo va tu tesis?”. Me gustaría que pudieras estar el día de su lectura.

Al resto de mi familia. Somos muchos y es difícil nombraros a todos.

A mis compañeras Maite e Isabel, con quien comparto el trabajo diario. Gracias por vuestro compañerismo y sobre todo vuestra amistad. A Mer, que también ha puesto su granito de arena en la elaboración de esta tesis. A Montse, por ser capaz de colgar el teléfono a los 30 minutos de conversación “para que sigas escribiendo lo de la tesis”. Gracias por esos 30 minutos de risas y de confianzas.

A Ihosvany y Elena por su gran ayuda en las técnicas realizadas.

Al resto de compañeros del Servicio de Hematología y Hemoterapia, médicos, enfermeras, auxiliares, técnicos y administrativos que de una u otra forma han contribuido también a que llegara hasta aquí.

Y por último a los más importantes, los pacientes, gracias a ellos y para ellos avanzamos cada día en nuestra profesión.

A todos, *MUCHAS GRACIAS*.

# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
1.1    Síndromes mielodisplásicos.....	23
1.1.1    Epidemiología.....	23
1.1.2    Etiología .....	23
1.1.3    Fisiopatología .....	24
1.1.3.1    Papel de la apoptosis .....	24
1.1.3.2    Origen celular y células hematopoyéticas.....	26
1.1.3.3    Alteración de la respuesta inmune .....	27
1.1.3.4    Alteraciones genéticas y moleculares .....	27
1.1.3.5    El microambiente medular .....	30
1.1.4    Diagnóstico.....	31
1.1.4.1    Estudio morfológico.....	33
1.1.4.2    Citogenética.....	35
1.1.4.3    Inmunofenotipo .....	36
1.1.4.4    Estudios moleculares.....	36
1.1.4.5    Otros estudios.....	37
1.1.5    Clasificación .....	38
1.1.6    Índices pronósticos .....	40
1.1.6.1    IPSS .....	40
1.1.6.2    Score MDACC .....	41
1.1.6.3    MPSS.....	42
1.1.6.4    WPSS .....	43
1.1.6.5    Score SMD hipoplásico.....	43

1.1.6.6	IPSS revisado .....	44
1.1.6.7	Nuevas variables pronósticas .....	46
A.	Ferritina.....	46
B.	Mielofibrosis .....	46
C.	Comorbilidades .....	47
D.	LDH .....	47
E.	Beta-2 microglobulina .....	48
1.1.7	Tratamiento.....	48
1.2	Hemostasia.....	50
1.2.1	Hemostasia primaria: fisiología de las plaquetas .....	50
1.2.1.1	Origen de las plaquetas .....	50
1.2.1.2	Estructura de las plaquetas .....	53
A.	Membrana plaquetaria .....	54
B.	Citoesqueleto y citoplasma .....	56
C.	Sistemas membranosos .....	57
D.	Orgánulos plaquetarios .....	58
E.	Estructuras inespecíficas.....	59
1.2.1.3	Activación plaquetaria.....	59
1.2.1.4	Micropartículas.....	63
1.2.2	Hemostasia secundaria .....	67
1.2.3	Técnicas para la evaluación global de la hemostasia .....	72
1.2.3.1	Trombinografía automática calibrada .....	72
1.2.3.2	Tromboelastometría rotacional (ROTEM®).....	74
1.3	Apoptosis de las plaquetas .....	78
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>81</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>

4.1.	Descripción de los pacientes incluidos en el estudio .....	91
4.2.	Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio .....	91
4.2.1.	Criterios de inclusión.....	91
4.2.2.	Criterios de exclusión comunes a pacientes y controles sanos.....	92
4.3.	Extracción y preparación de las muestras.....	92
4.4	Análisis de las muestras .....	93
4.4.1	Recuento celular .....	93
4.4.2	Estudio de la activación plaquetaria .....	93
4.4.3	Estudios con el PFA-100® .....	94
4.4.4	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas.....	94
4.4.4.1	Expresión de fosfatidilserina en la superficie plaquetaria.....	94
4.4.4.2	Medición de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 .....	95
4.4.4.3	Análisis de las proteínas BAX, BAK, BCL-2 y BCL-X <sub>L</sub> .....	95
4.4.5	Determinación de los niveles de TPO en plasma .....	96
4.4.6.	Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas.....	96
4.4.7	Estudio de la capacidad procoagulante del plasma asociada a micropartículas .....	97
4.4.8	Caracterización del origen celular de las micropartículas .....	97
4.4.9	Técnicas para la evaluación global de la hemostasia .....	98
4.4.9.1	Trombinografía automática calibrada .....	98
4.4.9.2	Tromboelastometría rotacional (ROTEM®).....	99
4.4.10	Método estadístico.....	99
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>101</b>
5.1	Pacientes incluidos.....	103
5.2	Recuento de células sanguíneas .....	104
5.3	Relación entre el número de plaquetas y los niveles de trombopoyetina .....	106
5.4	Estudio de la producción de plaquetas inmaduras .....	107

5.5	Estudio de la funcionalidad plaquetaria.....	108
5.6	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas .....	114
5.6.1	Exposición de fosfatidilserina .....	114
5.6.2	Expresión de proteínas pro y antiapoptosis .....	117
5.7	Estudio de la capacidad procoagulante asociada a micropartículas.....	122
5.8	Caracterización del origen celular de las micropartículas .....	123
5.9	Capacidad procoagulante del plasma.....	124
5.10	Cinética de formación del coágulo .....	125
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
6.1	Recuento de plaquetas y masa plaquetaria según el IPSS .....	131
6.2.	Niveles de TPO y número de plaquetas.....	131
6.3	Plaquetas inmaduras en los pacientes con SMD.....	132
6.4	Características funcionales de las plaquetas .....	132
6.5	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas .....	133
6.6	Capacidad procoagulante asociada a micropartículas.....	134
6.7	Técnicas globales para el estudio de la hemostasia .....	136
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>159</b>
<b>10.</b>	<b>COMUNICACIONES A CONGRESOS.....</b>	<b>173</b>



# **ABREVIATURAS**



<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ALT</b>	Alanina-aminotransferasa
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>AP</b>	Altura del pico
<b>APAF</b>	Factor activador de la proteasa apoptótica
<b>AR</b>	Anemia refractaria
<b>AREB</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos
<b>AREB-t</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
<b>ARN<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARS</b>	Anemia refractaria sideroblástica
<b>ARSA</b>	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
<b>ASGPR</b>	Asialoglicoproteína
<b>AST</b>	Aspartato-aminotransferasa
<b>ATG</b>	Globulina antitumoral
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>CAT</b>	Trombinografía automática calibrada
<b>CEIC</b>	Comité Ético de Investigación Clínica
<b>CFT</b>	Tiempo de formación del coágulo
<b>CHCM</b>	Concentración de hemoglobina corpuscular media
<b>CMF</b>	Citometría de flujo
<b>CMM</b>	Células madre mesenquimales
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CRDM</b>	Citopenia refractaria con displasia multilínea
<b>CRDU</b>	Citopenia refractaria con displasia unilínea
<b>CT</b>	Tiempo de coagulación
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ETP</b>	Potencial endógeno de trombina
<b>F</b>	Factor
<b>FAB</b>	Franco-Americano-Británico
<b>FCH</b>	Factores de crecimiento hematopoyético
<b>FII</b>	Protrombina
<b>FIIa</b>	Trombina

<b>FISH</b>	Hibridación in situ fluorescente
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>FIX</b>	Factor IX
<b>FIXa</b>	Factor IX activado
<b>FIXa-FVIIIa</b>	Complejo tenasa
<b>FT</b>	Factor tisular
<b>FV</b>	Factor V
<b>FVa</b>	Factor V activado
<b>FVIIa</b>	Factor VII activado
<b>FVIII</b>	Factor VIII
<b>FVIIIa</b>	Factor VIII activado
<b>FVW</b>	Factor von Willebrand
<b>FX</b>	Factor X
<b>FXa</b>	Factor X activado
<b>FXa-FVa</b>	Complejo protrombinasa
<b>FXI</b>	Factor XI
<b>FXIa</b>	Factor XI activado
<b>FXII</b>	Factor XII
<b>FXIIa</b>	Factor XII activado
<b>FXIII</b>	Factor XIII
<b>FXIIIa</b>	Factor XIII activado
<b>GESMD</b>	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
<b>GMP<sub>c</sub></b>	Guanosín-monofosfato cíclico
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>GR</b>	Granulocitos
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HMWK</b>	Quininógeno de alto peso molecular
<b>HUMARA</b>	Gen del receptor de andrógenos humano
<b>ICUS</b>	Citopenia idiopática de significado incierto
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INF</b>	Interferón
<b>IP<sub>3</sub></b>	Fosfoinositol-1,4,5-trifosfato
<b>IPSS</b>	Índice pronóstico internacional
<b>IPSS-R</b>	Índice pronóstico internacional revisado

<b>IV</b>	Índice de velocidad
<b>K</b>	Calicreína
<b>LAM</b>	Leucemia aguda mieloblástica
<b>LMMC</b>	Leucemia mielomonocítica crónica
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MCF</b>	Firmeza máxima del coágulo
<b>MDACC</b>	<i>MD Anderson Cancer Center</i>
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>MPs</b>	Micropartículas
<b>MPSS</b>	<i>MD Anderson Prognostic Scoring System</i>
<b>Neu</b>	Sialidasa
<b>NR</b>	Neutropenia refractaria
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAS</b>	Ácido peryódico de Schiff
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adhesión plaqueta-endotelio 1
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PK</b>	Precalicreína
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLs</b>	Fosfolípidos
<b>PPF</b>	Plasma libre de plaquetas
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PPP</b>	Plasma pobre en plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico en plaquetas
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PSGL-1</b>	Ligando glicoproteico 1 de la P-selectina
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SMD</b>	Síndromes mielodisplásicos
<b>SP</b>	Sangre periférica
<b>TAP</b>	Tiempo al pico
<b>TFPI</b>	Inhibidor de la vía del factor tisular
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante β

<b>TL</b>	Tiempo de latencia
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TO</b>	Tiempo de obturación
<b>TPO</b>	Trombopoyetina
<b>TR</b>	Trombocitopenia refractaria
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF
<b>TRAP</b>	Péptido activador del receptor de trombina
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VPM</b>	Volumen plaquetario medio

# **LISTA DE FIGURAS**





<b>Figura 1.</b>	Ejemplos de frotis con rasgos displásicos de las tres líneas celulares.....	34
<b>Figura 2.</b>	Estadios evolutivos en la megacariopoyesis.....	52
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la estructura de las plaquetas.....	54
<b>Figura 4.</b>	Representación de los receptores plaquetarios y sus ligandos.....	56
<b>Figura 5.</b>	Representación de los principales procesos que ocurren en la hemostasia primaria.....	61
<b>Figura 6.</b>	Esquema que representa la activación de las plaquetas.....	62
<b>Figura 7.</b>	Micropartículas como mediadores de señalización .....	64
<b>Figura 8.</b>	Sistemas implicados en el mantenimiento de la membrana plaquetaria.....	65
<b>Figura 9.</b>	Mecanismo de formación de micropartículas.....	66
<b>Figura 10.</b>	Representación esquemática de los mecanismos que participan en la vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación.....	69
<b>Figura 11.</b>	Fase de amplificación de la coagulación .....	70
<b>Figura 12.</b>	Fase de propagación de la coagulación .....	71
<b>Figura 13.</b>	Ejemplo del trazado que se obtiene en la trombinografía automática calibrada.....	73
<b>Figura 14.</b>	Representación de las partes fundamentales del tromboelastómetro y su mecanismo de funcionamiento .....	75
<b>Figura 15.</b>	Representación de un tromboelastograma con los parámetros más utilizados .....	76
<b>Figura 16.</b>	Representación de las dos vías de activación de la apoptosis en células nucleadas.....	79
<b>Figura 17.</b>	Papel de la apoptosis en megacariocitos y plaquetas.....	80
<b>Figura 18.</b>	Recuento de eritrocitos, contenido de hemoglobina, VCM y CHCM en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS .....	104
<b>Figura 19.</b>	Porcentaje de linfocitos, granulocitos, monocitos y neutrófilos en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el IPSS .....	105
<b>Figura 20.</b>	Recuento de plaquetas y VPM en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.....	106
<b>Figura 21.</b>	Niveles plasmáticos de TPO y su relación con el número de plaquetas...	107
<b>Figura 22.</b>	Plaquetas inmaduras y su relación con el recuento plaquetario .....	108
<b>Figura 23.</b>	Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas .....	109
<b>Figura 24.</b>	Relación entre el recuento y la función plaquetaria.....	110

<b>Figura 25.</b> Expresión de la subunidad alfaIIb del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas .....	111
<b>Figura 26.</b> Expresión de la subunidad beta3 del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas .....	111
<b>Figura 27.</b> Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas .....	112
<b>Figura 28.</b> Función plaquetaria determinada con PFA-100® .....	113
<b>Figura 29.</b> Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas.....	114
<b>Figura 30.</b> Relación entre la unión de anexina V a la superficie plaquetaria y el recuento plaquetario.....	115
<b>Figura 31.</b> Relación entre la activación del receptor de fibrinógeno y la exposición de fosfatidilserina .....	116
<b>Figura 32.</b> Expresión de proteínas proapoptosis: BAX.....	117
<b>Figura 33.</b> Relación entre la expresión de BAX y el número de plaquetas y la exposición de fosfatidilserina .....	118
<b>Figura 34.</b> Expresión de proteínas proapoptosis: BAK.....	119
<b>Figura 35.</b> Expresión de proteínas antiapoptosis: BCL-2 .....	119
<b>Figura 36.</b> Expresión de proteínas antiapoptosis: BCL-X <sub>L</sub> .....	120
<b>Figura 37.</b> Relación entre la expresión de BAK, BCL-2, BCL-X <sub>L</sub> y el número de plaquetas .....	120
<b>Figura 38.</b> Actividad de caspasas en las plaquetas.....	121
<b>Figura 39.</b> Actividad procoagulante asociada a micropartículas .....	122
<b>Figura 40.</b> Detección del origen celular de las micropartículas .....	123
<b>Figura 41.</b> Test de generación de trombina.....	124
<b>Figura 42.</b> Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (1).....	125
<b>Figura 43.</b> Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (2).....	126
<b>Figura 44.</b> Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (3).....	127
<b>Figura 45.</b> Resistencia a la proteína C.....	128

# **LISTA DE TABLAS**



<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de los pacientes con SMD según la OMS 2008.....	39
<b>Tabla 2.</b>	Índice Pronóstico Internacional .....	41
<b>Tabla 3.</b>	Score MDACC para pacientes con SMD de bajo riesgo .....	41
<b>Tabla 4.</b>	Índice pronóstico MPSS .....	42
<b>Tabla 5.</b>	Índice pronóstico WPSS .....	43
<b>Tabla 6.</b>	Grupos de riesgo según score SMD hipoplásico .....	44
<b>Tabla 7.</b>	Categorías de riesgo citogenético incluidas en el IPSS-R.....	45
<b>Tabla 8.</b>	IPSS-R .....	46
<b>Tabla 9.</b>	Características de los pacientes incluidos en el estudio según su grupo de riesgo.....	103

# RESUMEN

## **ANTECEDENTES**

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células progenitoras hematopoyéticas caracterizados por displasia cualitativa y/o cuantitativa y en consecuencia una hematopoyesis ineficaz en una o más líneas celulares, lo que puede provocar anemia, neutropenia y/o trombocitopenia en grado y combinaciones variables. La trombocitopenia se considera un factor pronóstico adverso tanto en la supervivencia global como en la evolución a leucemia mieloide aguda (LMA). No se conocen con detalle los mecanismos fisiopatológicos que producen trombocitopenia en este grupo de pacientes.

Se ha estimado que aproximadamente el 10% de los pacientes con SMD fallecen por complicaciones hemorrágicas, lo que no siempre se correlaciona con la cifra plaquetaria. Por el contrario, en otros pacientes con SMD y marcada trombocitopenia, la clínica hemorrágica es escasa, lo que podría explicarse por la existencia de mecanismos compensatorios de la tendencia hemorrágica en estos pacientes.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de esta tesis son: 1) caracterizar la regulación de la producción de plaquetas por trombopoyetina (TPO) estudiando la relación entre el número de plaquetas, los niveles plasmáticos de TPO y la producción de plaquetas inmaduras en los pacientes con SMD; 2) evaluar la capacidad de activación de las plaquetas y su apoptosis; 3) estudiar la existencia de mecanismos hemostáticos compensatorios de la trombocitopenia y de la disfunción plaquetaria.

## **MÉTODOS**

Se incluyeron 75 pacientes con SMD y 68 controles sanos con distribuciones de edad y sexo similares a las del grupo de pacientes.

Para evaluar la función plaquetaria, cuantificar las plaquetas inmaduras y determinar la presencia de signos de apoptosis en las plaquetas (expresión de fosfatidilserina, actividad de caspasas 3/7, 8 y 9) se utilizó la citometría de flujo. El contenido plaquetario de las proteínas proapoptóticas BAK y BAX y de las antiapoptóticas BCL-2 y BCL-X<sub>L</sub> se determinaron por Western Blot. El tiempo de obturación se determinó por el sistema PFA-100®. Los niveles plasmáticos de TPO se

determinaron por ELISA. El estudio de la capacidad procoagulante del plasma asociado a micropartículas (MPs) se determinó mediante un método cromogénico utilizando dos kits diferentes de ZYMUPHEN. La identificación del origen celular de las MPs se realizó por citometría de flujo. Para evaluar las características cinéticas de la formación del coágulo se utilizó el ROTEM® y para evaluar la capacidad procoagulante del plasma se usó la trombinografía automática calibrada (CAT).

## **RESULTADOS**

Los pacientes con SMD y trombocitopenia presentaron niveles plasmáticos de TPO elevados, mientras que en aquellos pacientes con cifra de plaquetas normales, los niveles de TPO fueron casi indetectables. El porcentaje de plaquetas inmaduras no se encontró aumentado en ninguno de los pacientes, cualquiera que fuera su recuento plaquetario, indicando un fallo funcional en la médula ósea.

Nuestros resultados mostraron una disminución en la activación plaquetaria inducida por agonistas y evaluada a través de la activación del receptor de fibrinógeno y la expresión de P-selectina, en las plaquetas de los pacientes con SMD, incluso en aquellos que presentaban una cifra normal de las mismas. Esta disminución en la capacidad de activación fue más grave en los pacientes con menor número de plaquetas y cuanto peor era su IPSS y no se debió a una menor expresión en su superficie de receptores para el fibrinógeno.

Se comprobó que las plaquetas de los pacientes con SMD expresaban más signos de apoptosis, medidos como expresión de fosfatidilserina en la superficie y un incremento de los niveles de las caspasas activadas 3/7, 8 y 9.

Observamos que la capacidad procoagulante asociada a MPs era mayor en los pacientes con SMD que en los controles sanos. Asimismo se observó que los pacientes con mayor número de plaquetas presentaban más MPs y que éstas, derivaban fundamentalmente de los monocitos

En el CAT no se encontraron diferencias en la capacidad procoagulante del plasma entre los pacientes con SMD y el grupo control. En el ROTEM® se mostró un estado de hipocoagulabilidad en los pacientes con SMD compatible con alteración en la funcionalidad plaquetaria. La lisis del coágulo fue menor en los pacientes con SMD.



## CONCLUSIONES

En los pacientes con SMD aunque los niveles de TPO suelen estar elevados, no son suficientes para estimular la megacariopoyesis, lo que sugiere que deben estar alteradas las vías de señalización intracelular involucradas en la producción de plaquetas. El número de plaquetas inmaduras no está aumentado en los pacientes con SMD, lo que indica un fallo funcional en la médula ósea de estos pacientes. Las plaquetas de los pacientes con SMD tienen menor capacidad de ser activadas por agonistas, lo que parece deberse a un aumento en su apoptosis. Los pacientes con SMD presentan un aumento en la capacidad procoagulante asociada a MPs procedentes de monocitos, lo que podría explicar el menor número de episodios hemorrágicos que observamos en estos pacientes. El ROTEM® demuestra que la alteración en la funcionalidad plaquetaria puede ser la responsable del perfil procoagulante disminuido en estos pacientes y que los pacientes con SMD presentan una disminución en la fibrinólisis que podría explicarse por el aumento en la resistencia a la proteína C y por el aumento de MPs observado en estos pacientes.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Síndromes mielodisplásicos

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células progenitoras hematopoyéticas. Se caracterizan por displasia cualitativa y/o cuantitativa y en consecuencia una hematopoyesis ineficaz en una o más líneas celulares, lo que puede producir anemia, neutropenia y/o trombocitopenia en grado y combinaciones variables. Esto provoca dependencia transfusional y riesgo de infección o hemorragia. Se caracterizan además por un riesgo incrementado de transformación a leucemia aguda [1, 2].

### 1.1.1 Epidemiología

La incidencia global de los SMD varía entre 2.1 y 12.6 casos por  $10^5$  habitantes/año, pero se aproxima a 50 casos por  $10^5$  habitantes/año en personas mayores de 70 años. La mediana de edad de los pacientes se encuentra entre 60 y 70 años con predominio en varones [1].

Es importante distinguir entre los SMD primarios, en los que no se conocen factores de riesgo o circunstancias predisponentes tales como exposiciones a tóxicos, y los SMD secundarios, que están asociados generalmente con la exposición a ciertos agentes quimioterápicos y/o radiación ionizante [3].

### 1.1.2 Etiología

La etiología de los SMD en la mayoría de los pacientes es desconocida. La asociación de estas patologías con la edad avanzada sugiere un daño genético causado por la exposición a agentes tóxicos y/o la susceptibilidad heredada. Varios agentes se han implicado en la etiología de algunos casos: alcohol, tabaco, radiación ionizante, tratamiento inmunosupresor, infecciones víricas, benceno, etc. Sin embargo, estos factores no son frecuentes pudiéndose encontrar antecedentes de los mismos únicamente en el 20-30% de los casos [4].

### **1.1.3 Fisiopatología**

En los SMD, tras el defecto de la célula madre hematopoyética traducido en citopenias periféricas, subyace una proliferación clonal de células hematopoyéticas con alteraciones morfológicas, citogenéticas y/o moleculares [1]. Aunque los mecanismos fisiopatológicos no se conocen con detalle, investigaciones recientes permiten mejorar dicho conocimiento y favorecer el diseño de nuevos tratamientos contra dianas terapéuticas específicas.

Se considera que el desarrollo de un SMD es un proceso gradual. Eventos oncogénicos no bien definidos dan lugar a una población celular genéticamente inestable con una capacidad proliferativa aumentada que condicionará nuevas alteraciones genómicas que, a su vez, influirán en la progresión de la enfermedad. Entre las alteraciones que condicionan el comportamiento anormal de esta población se describe el daño a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN) junto a mecanismos defectuosos de reparación del mismo, vías de transducción de señal alteradas, incremento de la apoptosis, un microambiente favorecedor del crecimiento de esta población y unos mecanismos de regulación de la respuesta inmune también alterados [5]. A continuación revisaremos estos procesos.

#### **1.1.3.1 Papel de la apoptosis**

Uno de los mecanismos implicados en la fisiopatología de los SMD y actualmente aceptado por la mayoría de los autores es el incremento en la apoptosis. La apoptosis justificaría la existencia de citopenias periféricas junto a una médula ósea normo o hipercelular. Queda por establecer de forma definitiva si este incremento en la apoptosis se produce en las células más inmaduras, en determinados progenitores o en ambas poblaciones. Pese a que este mecanismo es aceptado por la mayoría de los autores, su relevancia clínica es controvertida.

Se sugiere que las señales de proapoptosis son el resultado de una señalización celular anormal y de una respuesta alterada de las células T que producen un exceso de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, varios de los mecanismos implicados en la fisiopatología de los SMD pueden además favorecer el incremento de la apoptosis.

El proceso de apoptosis se divide en dos vías, la extrínseca y la intrínseca. La activación de la vía extrínseca está mediada por la unión de los ligandos de muerte celular a los receptores transmembrana de las células. Por otro lado, el estrés y el daño celular pueden iniciar la activación intrínseca de las procaspasas. En esta vía, las mitocondrias son estimuladas para liberar citocromo c, el cual forma un complejo con APAF-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa 9 y activar así la ruta de las caspasas que desencadena finalmente la apoptosis [6].

Algunos autores sugieren la alteración de la vía extrínseca como la razón principal del aumento de la apoptosis en los SMD. Se ha descrito que este incremento en la apoptosis se debe a un aumento en la señalización a través de receptores de muerte celular. Las células hematopoyéticas de los pacientes con SMD presentan una expresión aumentada de algunas moléculas como CD95 (FAS) y TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF) que son receptores de muerte celular [7]. Se produce igualmente un incremento en sus ligandos, TNF $\alpha$  y FAS-ligando, cuyo origen es incierto, habiéndose implicado en su producción a macrófagos, células del estroma medular o linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, se ha descrito que las propias células hematopoyéticas de los pacientes con SMD presentan una expresión aumentada de TNF $\alpha$  y FAS-ligando, por lo que se podría producir un estímulo continuado de esta vía por un mecanismo autocrino [5].

La vía mitocondrial de la apoptosis también puede estar implicada en este proceso, sobre todo en los casos de SMD en los que un componente celular importante son los sideroblastos en anillo. En estos casos, el depósito anómalo de hierro en las mitocondrias podría estimular esta vía mitocondrial implicada en la apoptosis [8].

En los subtipos de SMD de bajo riesgo la apoptosis es mayor y va disminuyendo con la progresión de la enfermedad [9]. Así se ha observado que la relación entre las proteínas BAX (proapoptótica) y BCL-2 (antiapoptótica) está aumentada en fases iniciales de los SMD y disminuye cuando la enfermedad está más avanzada [10]. Estos estudios apoyan la hipótesis de que el equilibrio relativo entre la muerte celular y la señalización de la célula por la supervivencia está asociado al aumento de la apoptosis observada en los progenitores de los SMD.

### 1.1.3.2 Origen celular y células hematopoyéticas

Una cuestión básica para conocer a fondo la fisiopatología de los SMD es saber en qué célula se originan dichos procesos. Los estudios realizados en pacientes con SMD y cariotipos anormales han demostrado la presencia de poblaciones mieloides y de células linfoides clonales. Además se ha observado que las células mesenquimales del nicho hematopoyético, las células endoteliales circulantes y las células madres hematopoyéticas muy primitivas, pueden pertenecer al clon patológico [11]. Estas últimas dan lugar a un fenotipo similar al del SMD cuando se trasplantan en ratones con inmunodeficiencia severa, cumpliendo así con el criterio principal para ser consideradas células madre neoplásicas. La célula madre hematopoyética de los SMD puede tener gran relevancia para el tratamiento, puesto que su estado de latencia y el contacto con el nicho hematopoyético las puede proteger de los agentes quimioterápicos, lo que podría ser la causa de la respuesta transitoria a los distintos abordajes terapéuticos de los pacientes con estas enfermedades [12].

Diferentes grupos han demostrado que en los SMD el número de progenitores hematopoyéticos está disminuido y que esta disminución es más evidente cuando existen alteraciones citogenéticas, las que dependiendo de sus características, les confieren comportamientos singulares *in vitro* [13].

Además, los progenitores hematopoyéticos de estos pacientes presentan una respuesta disminuida o incluso anómala a los factores de crecimiento (FCH). Esta disminución en la respuesta puede favorecer los fenómenos de apoptosis. En algunos casos los progenitores pueden responder de forma adecuada a los FCH cuando se encuentran a concentraciones farmacológicas en el medio de cultivo [14].

Otra alteración funcional de las células progenitoras de los SMD que puede también favorecer su apoptosis es la disminución de algunas moléculas implicadas en la adhesión al estroma medular [15].

En los pacientes con SMD las células madre clonales y policlonales probablemente coexisten. Las diferencias biológicas e inmunofenotípicas entre estos dos tipos de células podrían utilizarse para el desarrollo de terapias dirigidas específicamente contra estas células [13].

### **1.1.3.3 Alteración de la respuesta inmune**

Aunque en muchos casos no se ha podido demostrar la clonalidad de los linfocitos, los pacientes con SMD frecuentemente presentan una alteración inmunológica que puede dar lugar a una mielosupresión autoinmune y contribuir así a una hematopoyesis ineficaz [14, 16]. La incidencia de trastornos autoinmunes está aumentada en estos pacientes [17] pero, a pesar de las evidencias clínicas e hipótesis planteadas al respecto, los mecanismos inmunológicos alterados siguen sin conocerse.

Las alteraciones descritas con más frecuencia son hipergammaglobulinemia y alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos T y de las células NK. Se cree que la mielosupresión observada en los SMD podría deberse a un proceso autoinmune mediado por los linfocitos T [18]. Varios estudios han demostrado la existencia de poblaciones linfocitarias T con expansión policlonal de subpoblaciones CD4+ o con expansión clonal u oligoclonal de células T citotóxicas (CD8+) en la sangre y médula ósea de estos pacientes [19]. Estos cambios son más pronunciados en los SMD de bajo riesgo, los que se caracterizan por presentar una disminución en el número de células T reguladoras (CD4+, CD25+ y FOXP3+). También existen pruebas de citotoxicidad autóloga contra las células precursoras. Según estas observaciones, la terapia inmunosupresora a veces es eficaz en pacientes con enfermedad de bajo riesgo, fundamentalmente en el subtipo hipoplásico, por la atenuación de la expansión de clones de linfocitos T. Algunos estudios han demostrado la desaparición de poblaciones clonales T en SMD respondedores a inmunosupresión y existen diversos trabajos que demuestran la eficacia del tratamiento con globulina antitimocítica (ATG) y/o ciclosporina en pacientes con SMD [20, 21].

La etapa tardía de la enfermedad se caracteriza por un aumento en el número de células T reguladoras. Al disminuir la respuesta autoinmune contra las células precursoras, se podría favorecer la proliferación clonal y la progresión de la enfermedad [22].

### **1.1.3.4 Alteraciones genéticas y moleculares**

Aproximadamente en el 50% de los pacientes con SMD primario se encuentran alteraciones citogenéticas clonales [23]. En estos pacientes los hallazgos más frecuentes

son alteraciones no balanceadas con pérdidas completas o parciales a nivel cromosómico: del(5q), -5, del(11q), del(12q), del(20q), del(7q), -7, del(17p) y del(13q) (11-13). Estas alteraciones citogenéticas y/o el número de ellas presentes en cada caso, reflejarían la inestabilidad genética de estos clones celulares y la tendencia a adquirir nuevas alteraciones. Por otro lado, la presencia de deleciones sugiere la pérdida de genes supresores de tumor o implicados en la reparación del ADN [24].

La pérdida total o parcial del cromosoma 5 es una de las alteraciones citogenéticas observadas más frecuentemente en los SMD. En el brazo largo del cromosoma 5 se localizan numerosos genes implicados en la regulación de la hematopoyesis, como los que codifican para las citoquinas y sus receptores, los reguladores del ciclo celular y los factores de transcripción. La posibilidad de que a este nivel se localice un gen supresor tumoral cuya pérdida sea la que condicione el inicio del síndrome 5q- ha llevado a la búsqueda de dicho gen. Para ello se ha delimitado la región crítica de pérdida genética a nivel de 5q31-32 que es diferente de la región definida en otros SMD o en la leucemia aguda mieloblástica (LAM) en los que está afectado el brazo largo del cromosoma 5 [25]. Muchos son los genes que se han mapeado en esta región, pero hasta el momento no se ha identificado ningún gen supresor tumoral responsable del proceso, aunque se han sugerido algunos (MEGF1, G-3BP) [26]. Se cree que la haploinsuficiencia de un gen que codifica a la proteína ribosómica RPS14 podría ser la causa del síndrome 5q- [27].

La pérdida total o parcial del cromosoma 7 se observa en el 10% de los SMD primarios y en el 50% de los secundarios. El segmento comúnmente delecionado se encuentra a nivel de la banda q22 e incluye 14 genes candidatos. Se piensa que el mecanismo implicado en estos procesos sería la haploinsuficiencia [28].

Otras alteraciones, como la del(20q) aislada se asocian con mínima displasia morfológica y trombocitopenia [29].

Las alteraciones moleculares de los SMD se conocen mucho menos que las que se producen en la LAM, siendo menos frecuentes las mutaciones puntuales. Para que se desarrolle una LAM se considera que se precisan al menos dos tipos de mutaciones: una mutación clase I que produzca una activación constitucional de moléculas con actividad tirosinquinasa o que afecte a algún miembro de la familia de oncogenes RAS y una mutación clase II que desregule un factor de transcripción hematopoyético o un



coactivador transcripcional. Esto va a producir alteraciones en el control de la proliferación/autorrenovación celular y por otro lado, una parada en la diferenciación. Sin embargo, estas alteraciones no se observan en los SMD [30]. De hecho, en estos procesos, aunque la diferenciación está alterada no se bloquea hasta el final del mismo, cuando se produce la transformación a LAM. Así algunas de las alteraciones descritas, comunes con las observadas en la LAM tales como mutaciones o duplicaciones internas en tándem de FLT3 se relacionan con la transformación de estos procesos a LAM. De igual manera, las mutaciones de NRAS son más frecuentes en estadios avanzados, por lo que se considera que puedan estar más relacionadas con la progresión de la enfermedad que con un evento primario [31]. Una de las pocas mutaciones puntuales que se han observado con cierta frecuencia (7-25% de los casos) afectan a AML1/RUNX1 pero se observan preferentemente en pacientes con SMD secundarios o en aquellos que tienen pérdidas del cromosoma 7 [32].

Otras anomalías que se han relacionado con estos procesos son amplificaciones del gen MLL o traslocaciones que dan lugar a nuevas proteínas de fusión como MLL-CBP y AML1-FOG2 [33].

Como se ha hecho en otras hemopatías, en los SMD también se ha estudiado el patrón de expresión génica utilizando la metodología de microarrays [34].

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo expuesto, podemos decir que diferentes genes con distintas funciones podrían participar en el desarrollo de los SMD: genes supresores de tumor, oncogenes y genes implicados en la regulación del ciclo celular o en los mecanismos de apoptosis [35].

Además de estas alteraciones genéticas, en los SMD también pueden estar alterados mecanismos epigenéticos que regulan la metilación del ADN y la deacetilación de las histonas [36]. En los SMD se ha descrito una metilación aberrante de p15, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y calcitonina [37]. Se ha demostrado que el número de loci que sufren metilación es mayor en los SMD de alto riesgo y durante la progresión de la enfermedad [37]. Otros genes que están frecuentemente afectados por la hipermetilación en los SMD son HIC1, CDH1 y ER. La hipermetilación de estos genes se asocia con un peor pronóstico en las primeras etapas de los SMD [38]. Esta diana biológica es la clave de los tratamientos hipometilantes que constituyen la terapia estándar de los SMD de alto riesgo.

En resumen, las alteraciones descritas a nivel genético y epigenético son muy variadas y afectan a distintos aspectos fisiopatológicos implicados en el desarrollo y evolución de estos procesos, poniendo de manifiesto la gran complejidad de los SMD.

### **1.1.3.5 El microambiente medular**

En los últimos años está tomando cuerpo la hipótesis de que para el desarrollo tumoral tienen una importancia clave tanto las células como el microambiente en el que éstas se desarrollan, ya que para que se produzca la enfermedad se necesita un ambiente “favorecedor” [39]. En los SMD se produce una alteración en los mecanismos de proliferación /diferenciación y un incremento de la apoptosis. Las células del estroma son productoras de gran número de citoquinas implicadas en regular estos procesos. Hasta qué punto las células del estroma son realmente defectuosas o simplemente su papel es reactivo, es algo que se está debatiendo ampliamente en los últimos años [40, 41].

Las células madre mesenquimales (CMM) son las células que originan los componentes del estroma medular. Algunos estudios demuestran que las CMM de pacientes con SMD presentan alteraciones genómicas en su capacidad proliferativa y en su fenotipo [42].

Se han planteado dos cuestiones básicas que en el momento actual aún no están completamente resueltas: ¿las células del estroma medular forman parte del clon neoplásico? y si no lo forman ¿son normales? Con respecto a la primera cuestión, la mayoría de los autores consideran que las células del estroma no pertenecen al clon tumoral [43]. Con respecto a la segunda cuestión, existen discordancias en cuanto a si el estroma medular es o no funcionalmente normal. Mientras algunos autores consideran que su capacidad de mantener la hematopoyesis es similar a los controles [44], otros consideran que esta capacidad es defectuosa y que la composición celular del estroma está alterada, con una proporción mayor de osteoblastos que las médulas óseas normales [45]. Los osteoblastos son componentes fundamentales del nicho de la célula madre hematopoyética y están implicados en su regulación [46].

Lo que no plantea dudas en el momento actual es que en los SMD se produce una secreción alterada de citoquinas, con mayor producción de citoquinas proinflamatorias y proapoptóticas por parte del estroma (TNF- $\alpha$ , INF, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) que disminuirían la

proliferación de los progenitores hematopoyéticos y promoverían su apoptosis. Si bien el componente celular responsable de su producción no está claramente definido, parecen estar implicados los macrófagos (por lo tanto, células pertenecientes al clon patológico), los linfocitos T y probablemente células del estroma medular [41].

El incremento de la angiogénesis es otro de los mecanismos implicados en la fisiopatología de diferentes hemopatías, entre ellas los SMD. Una de las citoquinas implicadas en este proceso sería el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). Varios grupos han estudiado la densidad de la microvasculatura en la médula ósea de pacientes con SMD y han comprobado que ésta se encuentra aumentada [47, 48]. Los progenitores hematopoyéticos, sobre todo los más inmaduros, poseen receptores para VEGF. Por este motivo, el incremento en la secreción de VEGF no actúa únicamente sobre la angiogénesis, sino que también produce un incremento de la proliferación promovido por un mecanismo autocrino y/o paracrino [49].

Todos estos datos, junto a los anteriormente referidos sobre la secreción de citoquinas por parte del estroma, parecen sugerir que efectivamente el estroma medular de pacientes con SMD está de alguna manera alterado y probablemente representa un ambiente favorecedor para el desarrollo de la enfermedad [50].

#### **1.1.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de los SMD es esencialmente morfológico y se basa en la presencia de una médula ósea normo o hiper celular, citopenias periféricas y alteraciones morfológicas celulares (dishemopoyesis). Las anomalías citológicas no son específicas de estos síndromes por lo que el diagnóstico ha de basarse en los hallazgos clínicos y la valoración cuantitativa y cualitativa de la morfología celular. Es imprescindible tener presente que mielodisplasia no es sinónimo de SMD. Al no disponer de un dato patognomónico de SMD, en todos los casos se debe excluir toda causa de citopenia y displasia transitoria. Los estudios deben realizarse tanto en sangre periférica como en médula ósea [51, 52].

El diagnóstico de los SMD debe establecerse según los criterios de la Organización Mundial de la Salud del año 2008 (OMS 2008) [53].

Se debe realizar estudio morfológico medular (aspirado) con tinción de May-Grünwald-Giemsa y tinción de Perls para evaluar el hierro depositado. La biopsia medular se reserva en casos de aspirado hipoplásico, sospecha de mielofibrosis y citopenia idiopática de significado incierto (ICUS).

En 2007 un grupo de expertos propuso unos criterios para el diagnóstico de esta patología, según los cuales este queda establecido si se cumplen unos prerequisites junto con al menos un criterio decisivo. Se contempla la condición de “alta sospecha de SMD” si solo se cumplen los co-criterios o si el único criterio decisivo es el cariotipo anormal [54].

### **Prerequisites**

Citopenia constante, con la exclusión de otras enfermedades como causa, en una o más de las líneas siguientes:

- Eritroide: hemoglobina <11 g/dL
- Neutrófila: neutrófilos <1.5x10<sup>9</sup>/L
- Megacariocítica: plaquetas <100x10<sup>9</sup>/L

### **Criterios decisivos (relacionados con el SMD)**

- Displasia en al menos el 10% de las células de una o más de las líneas mieloides en médula ósea.
- 5-19% de blastos en médula ósea.
- Anomalías cromosómicas típicas por citogenética o FISH (hibridación in situ fluorescente).

### **Co-criterios: cuando se cumplen los prerequisites pero no los criterios decisivos y presenta clínica**

- Fenotipo atípico en médula ósea por citometría de flujo que indica población monoclonal.
- Datos moleculares de clonalidad: estudio mediante HUMARA (gen del receptor de andrógenos humano) perfil génico, mutaciones puntuales (RAS).
- Disminución de formación de colonias en médula ósea y sangre periférica.

### 1.1.4.1 Estudio morfológico

La displasia se define por una serie de alteraciones citológicas que afectan a las líneas celulares mieloides en todos sus estadios madurativos, desde las células más indiferenciadas hasta sus estadios más maduros (Figura 1). Esta puede afectar a una o varias líneas y su cuantificación es un criterio básico para establecer el diagnóstico según los criterios de la OMS [53].

#### **Displasia de la serie eritroide (diseritropoyesis)**

Se recomienda evaluar las dismorfias en al menos 200 eritroblastos poliorcromáticos. En los hematíes en sangre periférica suele observarse macrocitosis, punteado basófilo, cuerpos de Höwell Jolly y/o anillos de Cabot. En el estudio morfológico medular, en las formas más inmaduras (eritroblastos) se observan alteraciones nucleares como puentes internucleares, cromatina picnótica, cambios megaloblásticos, irregularidades del contorno nuclear, mitosis anómalas, cariorrexis, multinuclearidad y protuberancias. Entre las alteraciones citoplasmáticas encontramos punteado basófilo grueso, vacuolización, distribución anómala de la hemoglobina y tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff) positiva. Con tinción de hierro (Perls) podemos observar los depósitos de hierro medular y realizar el recuento porcentual de sideroblastos. Se considera sideroblasto tipo 1 al que presenta entre 1 y 5 gránulos sideróticos, tipo 2 al que presenta más de 5 gránulos sideróticos dispersos por el citoplasma y sideroblastos anillados o tipo 3 al que tiene más de 5 gránulos en disposición perinuclear (ocupando 1/3 o más del contorno nuclear).

#### **Displasia de la serie granulocítica (disgranulopoyesis)**

Se recomienda evaluar las dismorfias en 200 elementos maduros de la serie granulocítica neutrófila. La displasia granulocítica, visible tanto en el núcleo como en el citoplasma celular y en la médula ósea como en la sangre periférica, incluye: gigantismo nuclear, hipersegmentación nuclear, hiposegmentación nuclear (pseudo-Pelger), núcleo en anillo, núcleo en espejo, alteración de la condensación cromatínica (clumping), apéndices nucleares, bolsillos nucleares, granulación gigante (pseudo-Chediak-Higashi), hipo/agranularidad, bastones de Auer, cuerpos de Döhle e hipogranulación.

Tanto la sangre periférica como la médula ósea pueden presentar blastos. La proporción de los mismos constituye uno de los parámetros más importantes en la clasificación de los SMD por lo que se requiere, según recomendaciones del grupo internacional de morfología en SMD, un conteaje sobre 500 células para establecer con seguridad ese porcentaje.

**Displasia de la serie megacariocítica (dismegacariopoyesis)**

Se recomienda valorar la displasia en 30 megacariocitos. Se caracteriza por la presencia de elementos monolobulados de distintos tamaños, asincronías madurativas núcleo/citoplasma, núcleos dispersos o micromegacariocitos de núcleo hipolobulado.

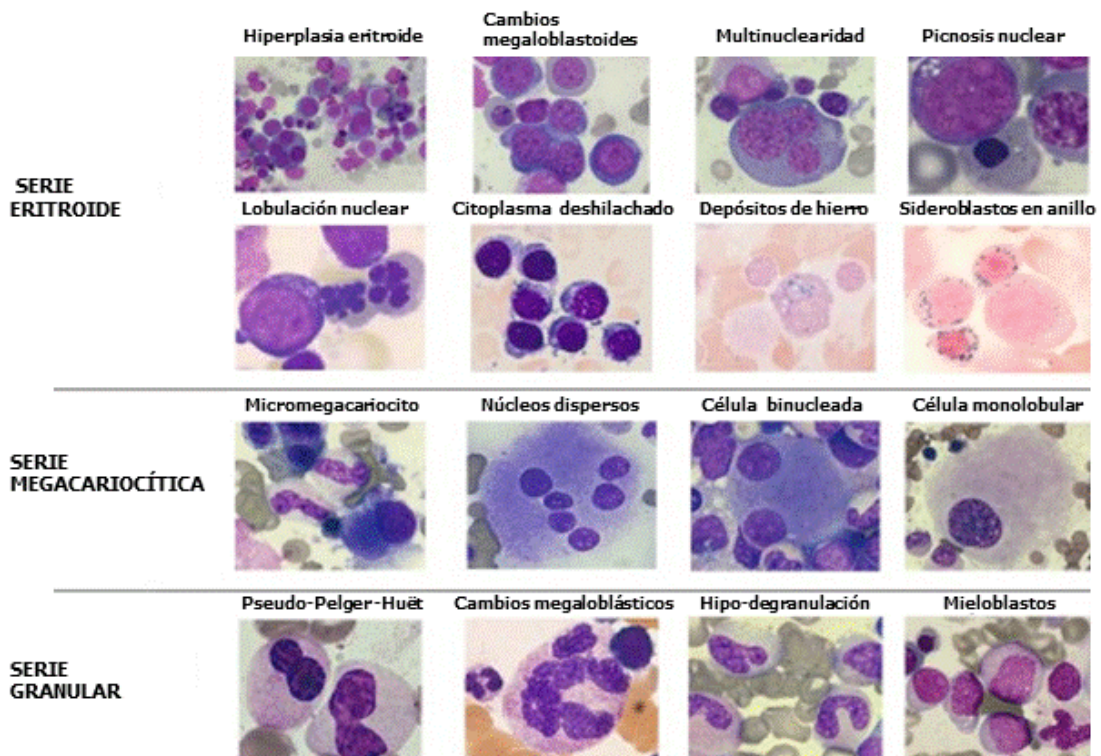


Figura 1. Ejemplos de frotis con rasgos displásicos de las tres líneas celulares.

Adaptada de Cazzola M. Blood, 2013. 122: 4021-34.

Algunas alteraciones morfológicas se asocian de manera característica a anomalías citogenéticas específicas:

- SMD asociados a delección aislada 5q-: micromegacariocitos con núcleo monolobulado o bilobulado.
- SMD asociados a del(17p): hipolobulación nuclear en neutrófilos (tipo Pelger) y presencia de vacuolas.
- Micromegacariocitos (en acúmulos): -7/-7q
- Displasia megacariocítica: 3q26
- Sideroblastos en anillo: del(11q)
- Sideroblastos patológicos (tipo 3 y 4): idic (X)(q13)
- Diseritropoyesis intensa: del(20q)
- Condensación cromatínica anómala: 12p-, +8

#### 1.1.4.2 Citogenética

La realización de un estudio citogenético convencional es imprescindible en el estudio inicial de los SMD y es siempre necesario para establecer el pronóstico individual y planificar adecuadamente el tratamiento [55].

Las alteraciones cromosómicas, sencillas o complejas, pueden estar presentes en el 30-50% de los pacientes con SMD en el momento del diagnóstico y pueden observarse en el 80% de ellos cambios durante la evolución y progresión de la enfermedad [56]. Generalmente, la presencia de un cariotipo alterado se asocia con un curso clínico más agresivo de la enfermedad. Los cariotipos complejos se observan en el 15-30% de los SMD [57].

En la clasificación de la OMS, algunas de las alteraciones citogenéticas frecuentes en los SMD como la trisomía 8, la delección de 20q y la pérdida del cromosoma Y, no se reconocen como marcadores clonales de SMD si no se cumplen los criterios morfológicos de la enfermedad [58]. La trisomía 8 puede ser constitucional en individuos sanos por lo que no se considera clonal, y por tanto, diagnóstica de SMD en ausencia de criterios morfológicos. La asociación de -Y con los SMD ha sido motivo de debate por ser una alteración asociada con la senectud [59]. Se ha observado que

individuos en los que todas las células del cariotipo mostraban -Y, presentaban una incidencia aumentada de SMD.

### **1.1.4.3 Inmunofenotipo**

Se recomienda determinar el inmunofenotipo de los pacientes con SMD por citometría de flujo (CMF) en aquellos casos en donde no existe una morfología y una citogenética concluyentes. En estos casos se ha sugerido que la detección de tres o más anomalías inmunofenotípicas en la maduración de la población eritroide, monocitoide o granulocítica por CMF es altamente sugestiva de SMD, ya que la correlación entre morfología, citogenética y CMF en SMD es alta [60].

El *European Leukemia Net Working Group* y un consorcio internacional publicaron en 2012 un documento que trata de estandarizar la identificación por CMF de las anomalías necesarias en los progenitores mieloides y monocíticos, así como en la maduración de la línea granulocítica, monocítica, eritroide y en la línea linfocítica B para definir displasia [61].

Una consideración especial merece el papel del inmunofenotipo en la cuantificación de blastos. La cuantificación de células blásticas en el diagnóstico de los SMD se establece por recuento morfológico. En general, para la cuantificación de blastos hay buena correlación entre el inmunofenotipo por CMF y la morfología basada en el recuento manual. Sin embargo, en algunos casos puede existir discordancia significativa debido a la mielofibrosis o la hemodilución de la muestra, por lo que se utiliza de forma excepcional, cuando el recuento manual no es posible.

### **1.1.4.4 Estudios moleculares**

La base molecular de los SMD se ha conocido gracias a los estudios de secuenciación masiva. Alrededor del 90% de los pacientes con SMD presentan al menos una mutación oncogénica y dos terceras partes de estas se detectan en individuos con cariotipo normal.

Se han identificado mutaciones recurrentes de genes implicados en la regulación de la función de las histonas (EZH2, ASXL1 y UTX) y en la metilación del ADN (DNMT3A, IDH1/IDH2 y TET2) que sugieren implicación activa en la patogénesis de



los SMD y su progresión a LMA. Las mutaciones en TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 y ASXL1 predicen una supervivencia más corta independientemente de otros factores pronósticos bien establecidos. Además, las mutaciones en RUNX1, TP53 y NRAS se asocian con trombocitopenia grave y con una elevada proporción de blastos medulares [62].

Entre cuatro y seis genes están mutados en el 10% de los pacientes con SMD (SF3B1, SRSF2, TET2 y ASXL1) [63] pero sólo la mutación del gen SF3B1 se ha relacionado con un fenotipo concreto, el de la anemia refractaria sideroblástica [64].

Actualmente se están aplicando técnicas de secuenciación masiva de paneles de genes implicados en la biología de los SMD con fines diagnósticos y pronósticos. Asimismo, un grupo de expertos está trabajando en el desarrollo de un índice pronóstico molecular que incluye parámetros clínicos, hematológicos y moleculares. Estas técnicas permitirán la caracterización molecular de cada paciente, que facilitará clasificarlo dentro de un grupo de riesgo determinado [65].

#### **1.1.4.5 Otros estudios**

En situaciones especiales el Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) recomienda la realización de otros estudios:

- Estudio de clonalidad mediante HUMARA sólo en mujeres con ICUS.
- Evaluación de la expresión de JAK2, en pacientes con trombocitosis.
- Estudio de las alteraciones de los genes PDGFRA, PDGFRB y FGFR1, en casos con eosinofilia.
- Evaluación de KIT (receptor transmembrana del tipo tirosin quinasa codificado por el proto-oncogén c-kit) en SMD asociados a mastocitosis sistémica.
- Cultivo de progenitores mieloides, porque puede ser útil en el estudio de citopenias de significado incierto ya que permite detectar patrones de crecimiento atípico de colonias mieloides.
- FISH puede ser útil y complementaria en aquellos pacientes en los que no se hayan conseguido metafases suficientes, que sean de calidad pobre o que tengan un cariotipo normal pero con menos de 20 metafases analizables.
- Tinción de PAS en extensiones de aspirado de médula ósea para valorar la reacción en la serie eritroide.

### **1.1.5 Clasificación**

En 1982, el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) publicó un sistema de clasificación que distingue cinco categorías de los SMD, basándose en el porcentaje de blastos existentes en médula ósea y sangre periférica, así como el porcentaje de sideroblastos en anillo y de monocitos en sangre periférica. Las cinco categorías descritas fueron: anemia refractaria (AR), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA), anemia refractaria con exceso de blastos (AREB), AREB en transformación (AREB-t) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) [66]. La característica principal distintiva de estos grupos es la proporción de blastos en la médula ósea: menos del 5% en AR y ARSA, de 5 a 20% en AREB, del 21 al 30% en AREB-t y de 0 a 20% en LMMC. Además, la ARSA se caracteriza por más del 15% de sideroblastos en anillo en la población de precursores eritroides y la LMMC se caracteriza por monocitosis ( $>1 \times 10^9$  células/L). Los sideroblastos en anillo, una característica definitoria de la ARSA, pueden también verse en otras variantes de la enfermedad y representan el transporte defectuoso de hierro entre las mitocondrias y el citoplasma, depositándose en las primeras.

En un intento de mejorar el valor pronóstico y la relevancia clínica de la clasificación FAB, en 2001 un grupo de expertos propuso la clasificación OMS. En esta se redujo el nivel de blastos necesario para el diagnóstico de LMA (20%) con lo que la categoría AREB-t se convertía en LMA, clasificando a la LMMC en una nueva categoría de neoplasia mieloide, que tiene características mielodisplásicas y mieloproliferativas y reconociendo a la citopenia refractaria con displasia multilineal con o sin sideroblastos en anillo y el síndrome 5q-, como formas de la enfermedad con rasgos distintivos [67].

En el 2008 el documento de la OMS fue nuevamente revisado [53] y esta clasificación es la que se utiliza actualmente ya que su valor pronóstico es claramente superior al de la FAB. Esta clasificación se basa en la valoración del número y tipo de citopenias, el porcentaje de células con displasia de las tres líneas mieloides, el porcentaje de blastos en sangre y médula ósea, el porcentaje de sideroblastos en anillo y el cariotipo de la médula ósea. A partir de estos datos se reconocen siete subtipos morfológicos. Estos pueden ser clasificados en tres grupos en base a la supervivencia y al riesgo de evolución a leucemia aguda. Los de riesgo bajo son la citopenia refractaria

con displasia unilínea (CRDU), la anemia refractaria sideroblástica (ARS) y el SMD con del(5q) aislada; los de riesgo intermedio son la citopenia refractaria con displasia multilínea (CRDM) y la anemia refractaria con exceso de blastos 1 (AREB-1) y de alto riesgo la anemia refractaria con exceso de blastos 2 (AREB-2) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los pacientes con SMD según la OMS 2008

<i>SUBTIPO DE SMD</i>	<i>HALLAZGOS EN SP</i>	<i>HALLAZGOS EN MO</i>
<b>CRDU: AR, NR, TR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uni o bicitopenia</li> <li>- Ausencia de blastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia unilínea <math>\geq 10\%</math> de células</li> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- <math>&lt; 15\%</math> de sideroblastos</li> </ul>
<b>ARS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia</li> <li>- No blastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sideroblastos <math>&gt; 15\%</math> de células</li> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- Displasia eritroide</li> </ul>
<b>CRDM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citopenia(s)</li> <li>- <math>&lt; 1\%</math> de blastos</li> <li>- Monocitos <math>&lt; 1 \times 10^9/L</math></li> <li>- No bastones de Auer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia multilínea <math>\geq 10\%</math> de células</li> <li>- <math>&lt; 15\%</math> de sideroblastos</li> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- No bastones de Auer</li> </ul>
<b>AREB-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citopenia(s)</li> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- Monocitos <math>&lt; 1 \times 10^9/L</math></li> <li>- No bastones de Auer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia uni o multilínea</li> <li>- 5-9% de blastos</li> <li>- No bastones de Auer</li> </ul>
<b>AREB-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citopenia(s)</li> <li>- 5-19% de blastos</li> <li>- Monocitos <math>&lt; 1 \times 10^9/L</math></li> <li>- <math>\pm</math> Bastones de Auer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia uni o multilínea</li> <li>- 10-19% de blastos</li> <li>- <math>\pm</math> Bastones de Auer</li> </ul>
<b>SMD con del(5q)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia</li> <li>- Plaquetas normales o aumentadas</li> <li>- <math>&lt; 1\%</math> de blastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- N° normal o elevado de megacariocitos con núcleo hipolobulado</li> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- Única anomalía citogenética: del(5q)</li> <li>- No bastones de Auer</li> </ul>
<b>SMD inclasificable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citopenias</li> <li>- <math>\leq 1\%</math> de blastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>&lt; 5\%</math> de blastos</li> <li>- Displasia <math>&lt; 10\%</math> en <math>\geq 1</math> línea mieloide</li> <li>- Alteración citogenética</li> </ul>

AR: anemia refractaria; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; ARS: anemia refractaria sideroblástica; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; CRDU: citopenia refractaria con displasia unilínea; MO: médula ósea; NR: neutropenia refractaria; OMS: Organización Mundial de la Salud; SMD: síndrome mielodisplásico; SP: sangre periférica; TR: trombocitopenia refractaria.

## **1.1.6 Índices pronósticos**

Los SMD son un grupo heterogéneo de patologías con gran variabilidad pronóstica tanto en el riesgo de evolución a LMA como de supervivencia global (SG) [68, 69]. Es importante establecer de forma individualizada el riesgo que presenta cada paciente para elegir terapias específicas. Para ello se han elaborado una serie de índices pronósticos con distinta aplicabilidad.

### **1.1.6.1 IPSS**

En 1997 Greenberg *et al.* desarrollaron el primer sistema pronóstico en esta patología, el IPSS (Índice Pronóstico Internacional) [70]. Tomó su punto de partida en dos índices pronósticos previamente publicados [71, 72] y en una serie de 816 pacientes con SMD primario, diagnosticados y no tratados en centros de reconocida experiencia en esta patología. Como se había observado en estudios previos, las tres variables que demostraron peor pronóstico independiente tanto para la SG como para el riesgo de evolución a LMA fueron el porcentaje de blastos medulares, el número de citopenias y determinadas alteraciones citogenéticas. La edad influyó en la SG pero no en el riesgo de progresión a LMA. El IPSS estratificó a los pacientes en cuatro categorías de riesgo con una mediana de supervivencia y una tasa de progresión a LMA estimadas por grupo.

El IPSS supone un sistema de cálculo sencillo, capaz de predecir el curso evolutivo de los pacientes tratados o no (Tabla 2). Además se puede emplear de forma dinámica, tanto al diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad. Por estas razones, desde su publicación se ha considerado el sistema de referencia para establecer el pronóstico individual y planificar el tratamiento.

Sin embargo, el IPSS presenta importantes limitaciones: no tiene en cuenta la gravedad de las citopenias, incluye un número limitado de alteraciones citogenéticas, la asignación inadecuada del riesgo para muchas alteraciones citogenéticas, así como la ausencia de otras características con peso pronóstico independiente ya demostrado [73].

**Tabla 2.** Índice Pronóstico Internacional

<i>VARIABLES</i>	<i>0 puntos</i>	<i>0.5 puntos</i>	<i>1 punto</i>	<i>1.5 puntos</i>	<i>2 puntos</i>
<b>Blastos en MO (%)</b>	<5	5-10		11-20	21-30
<b>Cariotipo*</b>	Bueno	Intermedio	Malo		
<b>Citopenias</b>	0-1	2-3			

\***Cariotipo:** bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q), como anomalías únicas; malo: complejo (3 o más anomalías) o anomalías del cromosoma 7; intermedio: otras anomalías únicas o dobles

**Grupo de riesgo:** bajo: 0 puntos; intermedio-1: 0.5-1 punto; intermedio-2: 1.5-2 puntos; alto:  $\geq 2.5$  puntos

### 1.1.6.2 Score MDACC

El *MD Anderson Cancer Center* (MDACC) propuso en el 2008 su propio índice pronóstico para pacientes con SMD de bajo riesgo (Tabla 3). En este score cinco variables, la citogenética, edad, hemoglobina, plaquetas y blastos, permiten clasificar a los pacientes en tres grupos pronósticos con diferentes supervivencias [74].

**Tabla 3.** Score MDACC para pacientes con SMD de bajo riesgo

<i>FACTOR ADVERSO</i>	<i>PUNTUACIÓN</i>
<b>Citogenética desfavorable*</b>	1
<b>Edad &gt;60 años</b>	2
<b>Hb &lt;10 g/dL</b>	1
<b>Plaquetas &lt;50 x10<sup>9</sup>/L</b>	2
<b>Plaquetas 50-200 x10<sup>9</sup>/L</b>	1
<b>Blastos &gt;4%</b>	1

\*Citogenética favorable: cariotipo normal, 5q. Citogenética desfavorable: resto de alteraciones

**Categorías pronósticas:** categoría 1 (0-2 puntos) supervivencia 80.3 meses  
categoría 2 (3-4 puntos) supervivencia 26.6 meses  
categoría 3 (5-7 puntos) supervivencia 14.2 meses

### 1.1.6.3 MPSS

Basados en un análisis multivariante de factores pronósticos en 1915 pacientes diagnosticados de SMD, Kantarjian *et al.* identificaron 8 variables con peso independiente y elaboraron un índice pronóstico, el MPSS (*MD Anderson Prognostic Scoring System*), que divide a los pacientes en cuatro grupos pronósticos con diferencias en la supervivencia (Tabla 4). Este índice es más preciso que el IPSS y permite ser aplicado a pacientes con SMD primario, secundario y LMMC [75].

**Tabla 4.** Índice pronóstico MPSS

PUNTUACIÓN	1	2	3
<b>VARIABLES</b>			
<i>Performance status</i>		≥2	
Edad	60-64	≥65	
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	50-199	30-49	
Hemoglobina (g/dL)		<12	
Blastos en MO (%)	5-10	11-29	
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)		>20	
Cariotipo			Cariotipo complejo Anomalías del cromosoma 7
Transfusiones	0-1	2-3	

**Grupos de riesgo:** bajo (0-4 puntos); intermedio-1 (5-6 puntos); intermedio-2 (7-8 puntos); alto (≥9 puntos)

### 1.1.6.4 WPSS

El grupo de Pavia demostró que la clasificación de la OMS, la dependencia transfusional y el cariotipo tenían valor predictivo independiente en SG y riesgo de transformación a LMA, y crearon con ellas el índice pronóstico WPSS (Tabla 5). Este índice es válido tanto al diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad [76]. Sin embargo, el uso del WPSS no se ha generalizado por varios motivos: la subjetividad en la valoración de la displasia morfológica, los criterios para iniciar la terapia transfusional y porque usa las mismas categorías de riesgo citogenético que el IPSS.

**Tabla 5.** Índice pronóstico WPSS

<i>VARIABLES</i>	<i>0 puntos</i>	<i>1 punto</i>	<i>2 puntos</i>	<i>3 puntos</i>
<b>Categoría de la OMS</b>	AR, ARSA, 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
<b>Cariotipo<sup>a</sup></b>	Bueno	Intermedio	Malo	
<b>Dependencia transfusional<sup>b</sup></b>	No	Regular		

**a. Cariotipo:** bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q), como anomalías únicas; malo: complejo (3 o más anomalías) o anomalías del cromosoma 7; intermedio: otras anomalías únicas o dobles

**b. Dependencia transfusional:** al menos una transfusión cada 8 semanas en un periodo de 4 meses

**Grupo de riesgo:** muy bajo: 0 puntos; bajo: 1 punto; intermedio: 2 puntos; alto: 3-4 puntos; muy alto: 5-6 puntos

### 1.1.6.5 Score SMD hipoplásico

En el caso de los pacientes con SMD hipocelular se ha propuesto un score pronóstico específico independiente del IPSS (Tabla 6). Este índice identifica tras el estudio de una cohorte de 253 pacientes con este subtipo de SMD, cinco variables como factores independientes adversos para la supervivencia. En base a ello establece tres categorías de riesgo [77].

**Tabla 6.** Grupos de riesgo según score SMD hipoplásico

Grupo de riesgo	Factores*	Mediana supervivencia (años)	Supervivencia 2/3 años
Bajo	0-1	30	62%/44%
Intermedio	2	19.4	43%/20%
Alto	3-5	7.3	12%/6%

\*Factores pronósticos: LDH >600 UI/L; blastos en MO >5%; Hb <10 g/dL; cariotipo desfavorable: monosomía cromosoma 7, delección 7q, cariotipo complejo; ECOG ≥2

### 1.1.6.6 IPSS revisado

En el 2012 se propuso una modificación del IPSS (IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional Revisado) que está basado en las variables ya presentes en este índice pero redefiniendo sus valores e incluyendo nuevas categorías [78]. Este score estratifica los pacientes en 5 grupos de riesgo, con diferencias en SG y riesgo de evolución a LMA. Además, identifica el papel de otros factores pronósticos como la edad, estado funcional, los niveles de ferritina sérica y de LDH que modifican la SG aunque no el riesgo de transformación a LMA.

El IPSS-R, a diferencia de otros índices pronósticos, evalúa el grado de las citopenias. En diversos estudios se ha demostrado que la gravedad de las mismas tiene peso pronóstico.

- El GESMD ha demostrado que en los pacientes con SMD de bajo riesgo, la neutropenia grave (neutrófilos  $<0.5 \times 10^9/L$ ) tiene pronóstico negativo tanto en la progresión a LMA como en SG [79]. Esta misma conclusión ha sido descrita por Breccia *et al.* en pacientes con SMD de riesgo bajo e intermedio [80].
- Malcovatti *et al.* en un estudio con 1344 pacientes observaron que niveles de hemoglobina menores de 8 g/dL en mujeres y de 9 g/dL en varones, suponen un impacto negativo en la mortalidad especialmente en pacientes con SMD de bajo riesgo. A partir de estos datos los niveles de hemoglobina se incluyeron en el



WPSS [81]. Estos resultados fueron posteriormente validados por el grupo de Massimo Breccia en 460 pacientes [82].

- La trombocitopenia grave ( $<30 \times 10^9/L$ ) es un factor pronóstico adverso en la evolución a LMA y SG en pacientes con IPSS bajo e intermedio-1, según demuestran los resultados del análisis de 2565 pacientes publicado por el GESMD [83].

Una de las principales limitaciones del IPSS es el escaso peso que tiene la citogenética respecto al resto de variables. El análisis de series muy amplias de pacientes ha permitido definir mejor el impacto pronóstico de las anomalías citogenéticas y precisar el papel de algunas anomalías no incluidas en el IPSS [24, 55, 73, 84-86]. Así, contrariamente a lo que ocurre con el IPSS, una serie cooperativa de 2351 pacientes demostró que las categorías de riesgo citogenético deberían tener un peso al menos similar al de la proporción medular de blastos [73]. Del mismo modo, un estudio cooperativo de 2902 pacientes con participación del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica ha sido capaz de definir 5 grupos pronósticos que reconocen 19 categorías citogenéticas específicas (Tabla 7) [86].

**Tabla 7.** Categorías de riesgo citogenético incluidas en el IPSS-R

<i>Subgrupo pronóstico</i>	<i>Anomalías citogenéticas</i>
<b>Muy bueno</b>	-Y, del(11q) aisladas
<b>Bueno</b>	Normal, del(5q), del(12p) y del(20q) aisladas y anomalías dobles que incluyen del(5q)
<b>Intermedio</b>	Del(7q), +8, +19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble independiente
<b>Pobre</b>	-7 e inv(3)/t(3q)/del(3q) aisladas, anomalías dobles que incluyen -7/del(7q) y anomalías complejas con 3 anomalías
<b>Muy pobre</b>	Anomalías complejas con >3 anomalías

Esta clasificación de riesgo citogenético ha sido adoptada por el IPSS-R (Tabla 8).

**Tabla 8.** IPSS-R

<i>Característica</i>	<i>0 puntos</i>	<i>0.5 puntos</i>	<i>1 punto</i>	<i>1.5 puntos</i>	<i>2 puntos</i>	<i>3 puntos</i>	<i>4 puntos</i>
<b>Grupo de riesgo citogenético</b>	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy pobre
<b>Blastos en MO (%)</b>	0-2		3-4.9		5-10	>10	
<b>Hb (g/dL)</b>	≥10		8-9.9	<8			
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	≥100	50-99	<50				
<b>PMN (x10<sup>9</sup>/L)</b>	≥0.8	<0.8					

**Grupo de riesgo:** muy bajo: 0-1.5 puntos; bajo: >1.5-3 puntos; intermedio: >3-4.5 puntos; alto: >4.5-6 puntos; muy alto: >6 puntos

### 1.1.6.7 Nuevas variables pronósticas

En los últimos años se están tratando de identificar nuevas variables con peso pronóstico en los SMD que mejoren la capacidad de predicción de los índices actuales.

#### A. Ferritina

El grupo de Pavia demostró que niveles de ferritina sérica superiores a 1000 ng/mL tenían un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes [76]. En un estudio del GESMD se objetivó que el efecto negativo de la sobrecarga de hierro era evidente no sólo en la SG, sino también en el riesgo de evolución a LMA en pacientes tanto de alto como de bajo riesgo según la clasificación de la OMS.

#### B. Mielofibrosis

La presencia de mielofibrosis moderada/grave (grado 2-3 del consenso europeo) se ha demostrado que es un factor adverso para la evolución a LMA y para la SG, tanto en pacientes con SMD de bajo o alto riesgo según la clasificación de la OMS [87].

La incidencia descrita de mielofibrosis moderada/grave en estos pacientes es de un 17% y varía según el subtipo de SMD, siendo más frecuente en los casos de AREB y CRDM [88]. La fibrosis, además, se asocia a trombocitopenia, presencia de progenitores mieloides inmaduros de localización atípica, blastos en sangre periférica, citogenética adversa, displasia multilínea y altos requerimientos transfusionales [87].

### **C. Comorbilidades**

En la supervivencia de los pacientes con SMD, la presencia de comorbilidades tiene especial importancia, ya que es una patología con una elevada incidencia en ancianos. La presencia de comorbilidades asociadas tiene impacto en el pronóstico de la mortalidad no relacionada con la enfermedad y en la SG. La valoración de las mismas en la toma de decisiones terapéuticas puede servir para definir los pacientes que se podrían o no beneficiar de tratamientos dirigidos a modificar la historia natural de su SMD.

Existen numerosas escalas de valoración de comorbilidades, pero fundamentalmente hay tres que pueden tener interés en los pacientes con SMD.

- Índice de Lee. Esta escala además de la valoración global de la comorbilidad, incorpora medidas de funcionalidad y su capacidad de predicción ha sido demostrada en los pacientes con SMD [89].
- Índice de Sorrow. Este sistema es aplicable en el trasplante hematopoyético y ha sido validado en pacientes con SMD [90].
- Índice de comorbilidad en SMD de Della Porta y Malcovatti (MDS-CI). Este índice tiene valor pronóstico independiente y su valor es especialmente relevante en pacientes con SMD de riesgo bajo, ya que permite identificar pacientes con baja probabilidad de transformación pero escasa esperanza de vida atribuible a la presencia de comorbilidades [91].

### **D. LDH**

Diferentes estudios han sugerido que el valor elevado de la LDH al diagnóstico y durante su evolución en los SMD de riesgo bajo e intermedio, supone un factor negativo

en cuanto a la supervivencia y riesgo de evolución a LMA, aunque este último punto no ha sido demostrado en todos los estudios [92, 93].

### **E. Beta-2 microglobulina**

La importancia de niveles elevados de beta-2 microglobulina (superiores a 2 mg/dL) ha sido estudiada por el grupo de Dusseldorf en 109 pacientes. En un análisis multivariante, la elevación de la beta-2 microglobulina demostró ser un factor pronóstico independiente al diagnóstico en SMD de alto riesgo para la supervivencia y el riesgo de transformación a LMA [94, 95]. Este dato no ha sido validado por otros grupos.

#### **1.1.7 Tratamiento**

Las recomendaciones para el tratamiento de los SMD se basan en guías de grupos de trabajos nacionales o internacionales en su mayoría. El grupo español de SMD ha publicado unas guías de diagnóstico y tratamiento para los SMD y la LMMC.

La decisión de iniciar tratamiento en estos pacientes debe basarse en su pronóstico individual. El objetivo del tratamiento en pacientes de alto riesgo es modificar la historia natural de la enfermedad y prolongar la supervivencia, por lo que son candidatos a tratamiento activo sin demora. En los pacientes con SMD de bajo riesgo el tratamiento tiene como objetivo mejorar la sintomatología y la calidad de vida, siendo las citopenias el motivo fundamental de inicio del mismo. Entre éstas, la principal causa de necesidad terapéutica es la anemia, y se debe considerar indicación de tratamiento cuando existen niveles de hemoglobina inferiores a 10 g/dL. La neutropenia y la trombocitopenia graves han de considerarse indicación de inicio de tratamiento por estar asociadas a mayor mortalidad y riesgo de transformación a LMA en el caso de la neutropenia.

El tratamiento de soporte supone una constante en los SMD, el cual está encaminado a la mejora de los síntomas o signos provocados inespecíficamente por la enfermedad. Este debe de contemplar el tratamiento de las citopenias, la sobrecarga férrica y las necesarias medidas de apoyo.

En los pacientes con SMD de bajo riesgo el tratamiento está dirigido a mejorar la calidad de vida del paciente, encaminándose todas las medidas hacia este objetivo terapéutico. Sin embargo, en los SMD de alto riesgo el objetivo además es modificar la historia natural de la enfermedad, prolongando la SG y reduciendo el riesgo de evolución a LMA. El abanico de posibilidades terapéuticas para este tipo de pacientes comprende terapia de soporte, 5-azacitidina, lenalidomida, quimioterapia de LMA o trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. La modalidad de tratamiento a emplear de forma individual debe adaptarse al perfil de riesgo y comorbilidades del paciente.

Como corresponde a un grupo heterogéneo de enfermedades, con distinto pronóstico y objetivos terapéuticos, la elección de la terapia debe realizarse de forma individualizada.

## **1.2 Hemostasia**

La hemostasia es un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular. La activación de este proceso depende de la compleja interacción entre factores muy diversos: la dinámica del flujo sanguíneo, los componentes de la pared vascular, las plaquetas y ciertas proteínas del plasma y los tejidos.

Clásicamente se ha dividido en tres etapas: hemostasia primaria, secundaria y fibrinólisis. En la hemostasia primaria participan fundamentalmente las plaquetas a través de los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación, para formar el tapón plaquetario. Estas tres etapas no son mecanismos independientes, sino íntimamente relacionados entre sí, de forma que hay factores que generados en una fase determinada pueden influir sobre las otras etapas. Además, existe una interrelación dinámica permanente entre el componente vascular, el sanguíneo celular (especialmente las plaquetas) y el sanguíneo humoral.

### **1.2.1 Hemostasia primaria: fisiología de las plaquetas**

Fue en 1886 cuando Eberth y Schimmelbusch definieron estas células como el pilar básico del proceso de coagulación sanguínea. Las plaquetas desarrollan en mayor o menor grado según los casos, los siguientes procesos: adhesión a una superficie, agregación entre sí, liberación de productos endógenos e iniciación y participación en la activación de la trombina.

#### **1.2.1.1 Origen de las plaquetas**

Fue Wright en 1906 quien sugirió que las plaquetas eran fragmentos procedentes de los megacariocitos. Efectivamente, se trata de células anucleadas que se forman en la médula ósea a partir de protuberancias de la membrana plasmática y del citoplasma de los megacariocitos. Así, un megacariocito maduro produce entre 1000 y 3000 plaquetas en un proceso denominado megacariopoyesis, regulado por factores de transcripción y citoquinas como la trombopoyetina (TPO).

La megacariocitopoyesis es un proceso que comprende la especialización de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales hacia los megacarioblastos

(progenitores de los megacariocitos). La proliferación y diferenciación de los megacarioblastos producirá promegacariocitos que, tras una poliploidización, darán lugar a los megacariocitos, células altamente especializadas que producirán plaquetas a través de su maduración y de la fragmentación de su citoplasma (Figura 2). El proceso de la producción de plaquetas a partir de los megacariocitos por un gran número de repeticiones del ADN, pero sin división celular, se denomina endocitosis. Por tanto, en este proceso podemos distinguir cuatro tipos de células:

*Megacarioblasto*: esta célula es parecida a la célula madre hematopoyética. Posee un ratio núcleo/citoplasma alto, debido a un incremento en la ploidía.

*Promegacariocito o megacariocito basófilo*: el núcleo casi ha finalizado de sintetizar el material genético y presenta contorno irregular. El citoplasma se hace mayor y más basófilo, con un aumento de la cantidad de gránulos presentes.

*Megacariocito granular*: esta célula posee un núcleo polilobular y un citoplasma que se va haciendo azurófilo de forma progresiva de manera similar a las plaquetas.

*Megacariocito maduro*: una vez alcanzado el estado de megacariocito maduro se inicia el proceso final de desarrollo, que terminará con la síntesis y liberación de las plaquetas en sangre periférica, lo que denominamos trombocitopoyesis. El megacariocito maduro, que se encuentra adyacente al estroma de médula ósea, sufre una serie de cambios morfológicos. En primer lugar ocurre la endomitosis nuclear y la síntesis de organelas, junto a la maduración y expansión citoplasmática, con formación de una serie de pseudópodos gruesos que contienen haces de microtúbulos de localización submembranosa. Organelas y gránulos migran a lo largo de los microtúbulos mientras los pseudópodos van elongándose progresivamente formando los procesos proplaquetarios. Estos procesos se irán curvando y ramificando a la vez que sufren constricciones a modo de cuentas de rosario. Finalmente, por retracción de los procesos plaquetarios, se desprenderán las proplaquetas más distales que después acabarán fragmentándose en plaquetas. Cada proplaqueta puede producir entre 100-200 plaquetas.

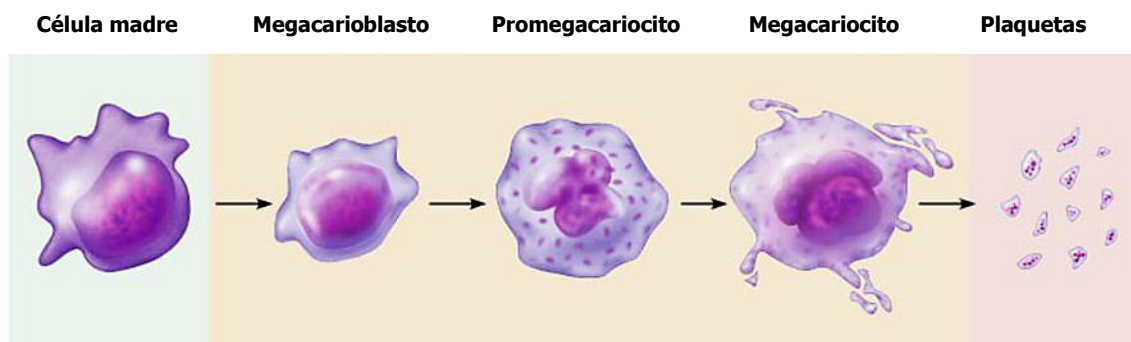


Figura 2. Estadios evolutivos en la megacariopoyesis

En un adulto se producen aproximadamente  $10^{11}$  plaquetas al día, para garantizar el mantenimiento de la concentración de las mismas en sangre. Su concentración normal en sangre es de 150.000 a 300.000 plaquetas/ $\text{mm}^3$  y su vida media es de 8 a 11 días, para, tras este período, ser destruidas por los macrófagos del sistema retículo-histiocitario del bazo, hígado y médula ósea.

La producción de plaquetas está fuertemente regulada por una serie de factores de crecimiento y citoquinas. El principal regulador de la megacariopoyesis es la TPO, ligando para el receptor Mpl [96] aunque otros factores como la IL-3, el factor SDF-1 y el microambiente en el que se desarrollan los megacarioblastos actúan en sinergia con la TPO durante las primeras etapas de expansión de las células progenitoras megacariocíticas [97, 98].

Los hepatocitos son la fuente principal de TPO y la regulación de su producción y secreción a la circulación ha sido un tema debatido durante años. Algunos autores proponían que sus niveles se regulaban por su captación a través de los receptores de alta afinidad Mpl presentes en las plaquetas y los megacariocitos y su posterior metabolización [99-101] mientras otros, sugerían que el número de plaquetas circulantes regulaban la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de TPO en el hígado y en la médula ósea [102].

Un estudio reciente demuestra que las plaquetas que han perdido el ácido siálico de las proteínas de su membrana (proceso asociado al envejecimiento) son captadas por los receptores Ashwell-Morell presentes en el hígado y subsecuentemente, estimulan la expresión del ARNm de TPO *in vivo* e *in vitro* a través de la vía JAK2 y STAT3 [103].



El receptor Ashwell-Morell pertenece a la familia de lectinas tipo C que reconocen y unen asialoglicoproteínas. Son complejos heterooligoméricos de transmembrana compuestos por las subunidades del receptor asialoglicoproteína 1 (ASGPR1; también conocidos como CLEC4H1 o HL-1) y el asialoglicoproteína 2 (ASGPR2; también conocidos como CLEC4H2 o HL-2) [104]. Se cree que este receptor también participa en la regulación de la hemostasia eliminando al factor von Willebrand (FVW) que ha perdido ácido siálico [105].

La pérdida de ácido siálico ocurre por activación de las sialidasas. En los mamíferos se han descrito 4 sialidasas (Neu 1-4) que hidrolizan los enlaces glucosídicos de los ácidos neuramínicos. La Neu 1 es lisosomal y preferentemente hidroliza el ácido siálico de glicoproteínas, la Neu 2 es citosólica, la Neu 3 y la Neu 4 están unidas a la membrana plasmática e hidrolizan preferentemente glicoproteínas de los gangliósidos [106]. En las plaquetas en reposo, la Neu 1 y la  $\beta$ -galactosidasa residen en múltiples gránulos pequeños dentro de las plaquetas y la Neu 3 en la superficie plaquetaria. Cuando las plaquetas envejecen o cuando se refrigeran por períodos prolongados, la Neu 1 y la  $\beta$ -galactosidasa se detectan en la superficie de las plaquetas, disminuye el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria y se hacen susceptibles de ser captadas por los receptores Ashwell-Morell.

### **1.2.1.2 Estructura de las plaquetas**

Las plaquetas son los corpúsculos más pequeños de la sangre con un diámetro de 0.5-3  $\mu\text{m}$  y 4-7  $\mu\text{m}^3$  de volumen. Presentan carga eléctrica negativa en su superficie y su morfología difiere según éstas se encuentren en reposo o activadas. En reposo, las plaquetas tienen forma discoidea, mientras que al activarse su morfología adopta forma irregular y esférica con emisión de pseudópodos.

La plaqueta es un órgano complejo anatómicamente, compuesto por diversas formaciones celulares que condicionan las múltiples funciones y acciones en las cuales se encuentran implicadas (Figura 3).

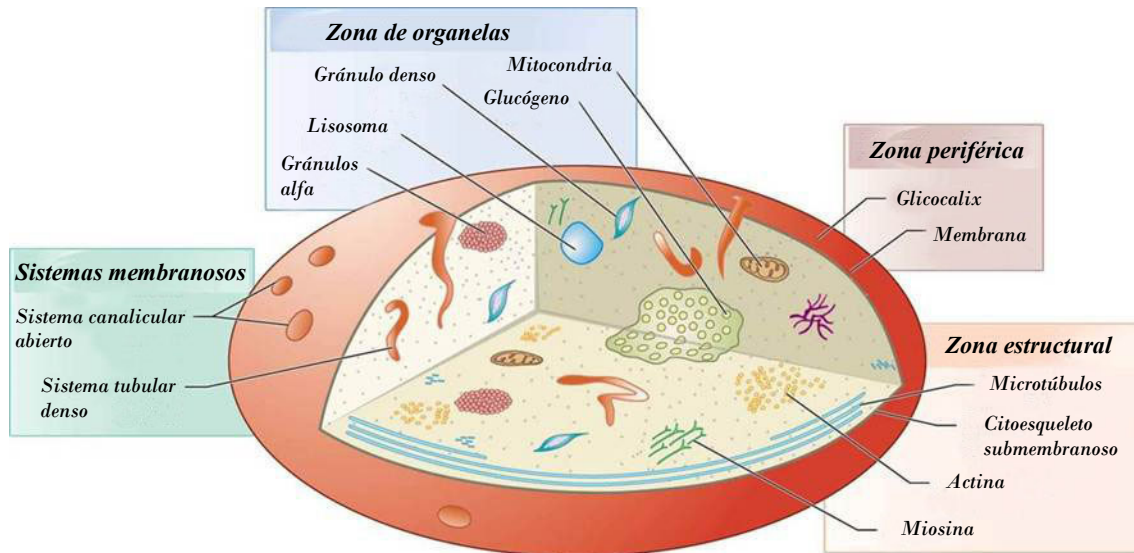


Figura 3. Esquema de la estructura de las plaquetas

### A. Membrana plaquetaria

La membrana de las plaquetas es una estructura trilaminar constituida por una bicapa lipoproteica con colesterol, lípidos neutros, glicolípidos y glicoproteínas. Estas últimas actúan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (difosfato de adenosina, trombina, tromboxano A<sub>2</sub>, fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondina, FVW). Esta estructura es la que permite que la membrana tenga un aspecto rígido y plástico, y que la plaqueta pueda llevar a cabo ciertas funciones [107].

Los fosfolípidos (PLs) presentes en la membrana tienen una distribución asimétrica en la misma, de forma que los cargados negativamente (como la fosfatidilserina, PS) se encuentran en la parte interna de la membrana, desempeñando una función procoagulante. Si la plaqueta está en reposo, estos fosfolípidos de la cara interna no podrán contactar con los factores plasmáticos que activan la coagulación. En cambio, durante la agregación plaquetaria, estos PLs se externalizan, contactando así con estos factores. Esta membrana es rica también en ácido araquidónico, el cual participa en la transmisión del estímulo recibido en la membrana durante la activación plaquetaria hacia las regiones celulares efectoras, mediante el metabolismo de los eicosanoides.

En la membrana plasmática encontramos las balsas lipídicas, unas zonas concretas de la membrana que son dominios de la misma ricos en colesterol y esfingolípidos, de un diámetro aproximado de 50 nm, encargados de organizar la unión de diferentes moléculas de señalización [108]. Su denominación de balsas se debe a que se encuentran flotando entre el resto de lípidos de la membrana plasmática, gracias a que forman una fase lipídica de mayor densidad que la del resto. Estas balsas lipídicas son importantes para la activación de muchas funciones celulares, incluyendo la adhesión y migración celular [109].

La membrana plasmática permite la interacción de la plaqueta con el medio exterior, gracias a receptores glicoproteicos (Figura 4). Varios de los receptores glicoproteicos pertenecen a la superfamilia de las integrinas. Las integrinas constituyen el grupo más importante de todas las moléculas de adhesión conocidas. Son glicoproteínas de membrana con estructura heterodimérica, resultantes de la asociación no covalente de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Las integrinas tienen varios estados conformacionales. En células en reposo, normalmente no son adhesivas, están presentes en la superficie celular pero en una conformación que las provee de baja afinidad para los ligandos. Cambios en la actividad celular pueden disparar señales que modifiquen su conformación para desarrollar una mayor afinidad [110]. Los dos receptores plaquetarios más importantes son la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, también conocida como la glicoproteína (GP) IIb/IIIa y el receptor para el FVW formado por las glicoproteínas GPIIb/GPV/GPIX.

La integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 es específica de las plaquetas y juega un papel importante en la formación del coágulo de fibrina. El complejo GPIIb/IIIa es el miembro más prevalente de la familia de integrinas de receptores de adhesión de la superficie plaquetaria y participa no solo en la adhesión sino también en la agregación plaquetaria al unirse al fibrinógeno. Además de ser receptor para el fibrinógeno se une también al FVW, vitronectina y fibronectina. El receptor para el FVW es la glicoproteína principal en el contacto inicial entre las plaquetas y la pared del vaso.

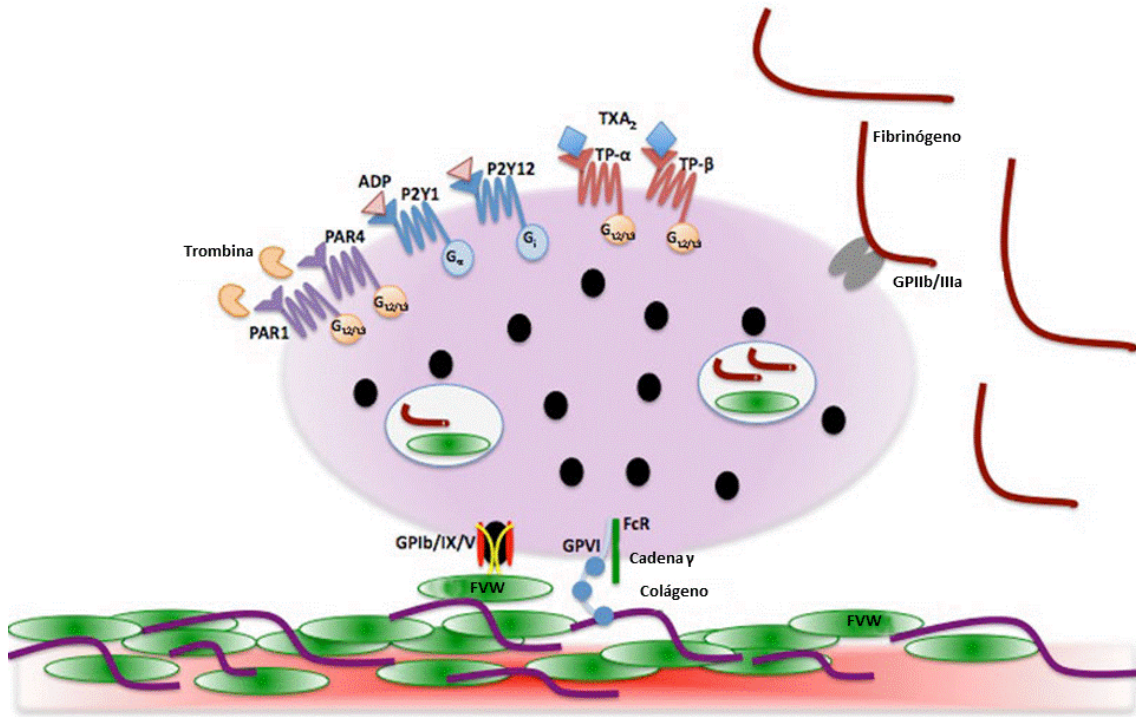


Figura 4. **Representación de los receptores plaquetarios y sus ligandos.** La GPIIb/IIIa se muestra en gris y su ligando el fibrinógeno se representa como hebras marrones. La GPIb/IX/V se muestra en rojo, negro y amarillo y su ligando el FVW en óvalos verdes. La GPVI se muestra en azul claro y su ligando, el colágeno, en hebras de color morado. La trombina (representada en naranja) activa a los receptores activados por proteasas (PAR1 y PAR4) que se muestran en color lila. El difosfato de adenosina (ADP, representado en triángulos rosados) se une a los receptores P2Y1 y P2Y12 que se muestran en azul. Los receptores TP- $\alpha$  y TP- $\beta$  se representan en color rosa y su ligando, el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), se muestra en forma de rombo de color azul. Los gránulos densos se representan en forma de círculos negros y los gránulos  $\alpha$  como óvalos blancos, que contienen en su interior FVW y fibrinógeno. Adaptada de Schmidt A. Clinical Chemistry, 2012. 52 (1).

## B. Citoesqueleto y citoplasma

Las plaquetas en estado de reposo presentan forma discoidal, gracias al andamiaje proteico que conforma su citoesqueleto. Éste se comporta como una estructura dinámica cuya composición varía con el estado de estimulación plaquetaria. El citoesqueleto está compuesto por microtúbulos y microfilamentos. La presencia de largos filamentos de actina forma una red de microtúbulos que le confiere la forma y consistencia, además, una parte del citoesqueleto reviste la superficie interna de la bicapa lipídica.

La actina es la proteína mayoritaria pero no la única. También coexisten otras como la miosina, la tropomiosina, proteína ligada a la actina, la  $\alpha$ -actinina, la albúmina o la trombostenina. La estabilidad de los filamentos se debe a la presencia de una proteína denominada capZ que los recubre, ya que la cofilina, que es la proteína capaz de desorganizarlos, está inactiva. Los filamentos se distribuyen en espiral desde el centro de la plaqueta hacia los márgenes celulares, donde giran y discurren paralelamente a la membrana plasmática. Los filamentos de actina también se unen directamente a las glicoproteínas de membrana. La conexión más importante de esta naturaleza es la que se produce con el dominio citoplasmático de la cadena  $Ib_\alpha$  del receptor para el FVW, con el complejo GPIb/IX/V y con la proteína filamina 1, esenciales para un correcto funcionamiento y una morfología normal en la plaqueta.

En el citoplasma se encuentra el glucógeno, gotas lipídicas y sustancias solubles que incluyen parte del calcio iónico, nucleótidos plaquetarios y componentes químicos que participan en la activación [111].

### C. Sistemas membranosos

Los más importantes son el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso.

*Sistema canalicular abierto:* es un sistema de canales ramificados interconectados que recorren toda la plaqueta y facilitan tanto la captación como la liberación de diferentes sustancias. Estos canales abiertos al exterior le dan a la plaqueta su configuración de esponja. Como está generado por una invaginación de la membrana de la plaqueta posee las tres capas de la misma. Sus funciones principales son dos, en primer lugar aumentar la superficie de contacto con el exterior facilitando los mecanismos de adhesión, agregación y el intercambio de sustancias entre membrana y zonas anatómicas más profundas de la plaqueta. En segundo lugar, sirve también como reservorio de proteínas y receptores de membrana [112].

*El sistema tubular denso:* constituido por un conjunto de canales más delgados que los del sistema canalicular abierto, con un contenido amorfo de densidad similar al citoplasma y que no conecta con la membrana externa. El sistema tubular denso es el principal reservorio tanto de calcio iónico como de ácido araquidónico y es el lugar de síntesis del tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) y las prostaglandinas, debido a que es donde se encuentra la enzima ciclooxigenasa [113].

## **D. Orgánulos plaquetarios**

Los orgánulos plaquetarios comprenden a los gránulos alfa, cuerpos multivesiculares y gránulos densos.

Gránulos alfa: presentan morfología esférica u oval y son los más numerosos, entre 40-60 por plaqueta. Miden unos 300-500 nm de diámetro. Están rodeados de una membrana simple y en su estructura interna se pueden distinguir 3 zonas: la nucleoide excéntrica, la matriz granular o zona intermedia y una zona periférica que contiene estructuras tubulares. Los gránulos  $\alpha$  son el lugar de almacenamiento de sustancias destinadas a ser secretadas en el momento de la activación de las plaquetas. Entre estas sustancias se encuentran proteínas específicas de las plaquetas, como son el factor plaquetario 4 o la  $\beta$ -tromboglobulina. También almacenan sustancias compartidas con el plasma como la albúmina, fibrinógeno, algunas inmunoglobulinas, fibronectina o el FVW. Diversos factores de crecimiento también se encuentran en estos gránulos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), lo que permite a estos gránulos modular activamente la formación de nuevos vasos en el sitio de reparación. En la cara interna de la membrana del gránulo se sitúan un conjunto de factores que con la activación de la plaqueta migran hacia la superficie y se expresan en la membrana, como son la GPIIb/IIIa, la P-selectina, el CD9, la molécula de adhesión plaqueta-endotelio 1 (PECAM-1) y la osteonectina.

Cuerpos multivesiculares: estructuras granulares de tamaño similar a los gránulos  $\alpha$  que contienen diversas vesículas redondeadas de 30-70 nm de diámetro.

Gránulos densos: poseen una zona central densa rodeada por un halo transparente y miden entre 200-300 nm de diámetro. Su función principal es la de reclutar plaquetas en el sitio donde se ha producido el daño vascular. Esto lo consigue liberando sustancias hemostáticamente activas una vez que se ha producido la activación de las plaquetas. Algunas de estas sustancias son: serotonina, pirofosfato, nucleótidos, calcio iónico y otros cationes. Asimismo, contienen pequeñas proteínas de unión al GTP (guanosina trifosfato) y moléculas de adhesión como la GPIb $\alpha$ , la GPIIb/IIIa y P-selectina [114].

## E. Estructuras inespecíficas

Dentro de este apartado se engloban elementos no específicos de las plaquetas que son comunes a otras células.

*Lisosomas*: son organelas de pequeño tamaño que contienen gran cantidad de enzimas degradativas, como las enzimas  $\beta$ -glucoronidasa, la catepsina, la fosfatasa ácida y  $\beta$ -galactosidasa. Su función principal es degradar el material ingerido por fagocitosis o pinocitosis.

*Vesículas revestidas*: son formaciones de 79-90 nm que se forman desde la membrana de la plaqueta o el sistema canalicular abierto y constituyen un mecanismo alternativo de endocitosis mediado por receptores.

*Microperoxidasa*: presentes en número escaso, son un tipo especial de gránulos de 90 nm de diámetro, en los que no se detecta catalasa por citoquímica.

*Mitocondrias*: son redondeadas o alargadas de un tamaño menor que las del resto de células. Su proporción es similar a los gránulos densos y su función está al servicio del metabolismo energético de la plaqueta.

*Ribosomas*: las plaquetas son muy pobres en ribosomas y raramente contienen retículo endoplásmico rugoso o vesículas del aparato de Golgi.

### 1.2.1.3 Activación plaquetaria

En condiciones fisiológicas las plaquetas circulan en la periferia de los vasos sin interactuar entre ellas ni con la superficie endotelial. Cuando se produce una lesión en un vaso sanguíneo, inicialmente se produce un espasmo vascular reflejo mediado por el sistema nervioso simpático. Esta vasoconstricción reduce el diámetro del vaso y limita el flujo de sangre que llega a la región dañada, contribuyendo de esta forma a una disminución temporal en la pérdida de sangre. Al mismo tiempo, al exponerse el subendotelio vascular, las plaquetas circulantes entran en contacto con la matriz subendotelial a través de interacciones entre el complejo plaquetario formado por las GP Ib/IX/V con el FVW que se encuentra tanto en el plasma como en la pared vascular. El FVW y la GPIb se unirán por zonas de anclaje a las fibras de colágeno tipo I y III que quedan expuestas en el subendotelio. Una vez que las plaquetas se adhieren a través de

la GPIb, se produce la activación plaquetaria mediante productos de secreción como el ADP, la adrenalina o el colágeno, y se producirá un cambio conformacional en el receptor para el fibrinógeno, la GPIIb/IIIa. Este hecho facilitará la agregación de las plaquetas. La estimulación de los receptores para estos agonistas produce señales que se denominan “*inside out*” que provocan un cambio en la estructura del receptor del fibrinógeno y un aumento de la afinidad por su ligando. Simultáneamente aumenta la afinidad de las integrinas plaquetarias  $\alpha 2\beta 1$  (receptor de colágeno),  $\alpha 6\beta 1$  (receptor de laminina) y  $\alpha 5\beta 1$  (receptor de fibronectina) que facilitan la adhesión firme de la plaqueta a la matriz subendotelial.

La secreción de serotonina y el TXA<sub>2</sub> contribuyen a la vasoconstricción de la zona lesionada, mientras que el ADP promueve la activación y el reclutamiento de nuevas plaquetas hacia el lugar dañado, y la epinefrina no produce agregación por sí misma, pero favorece la agregación mediada por otros agonistas (Figura 5).



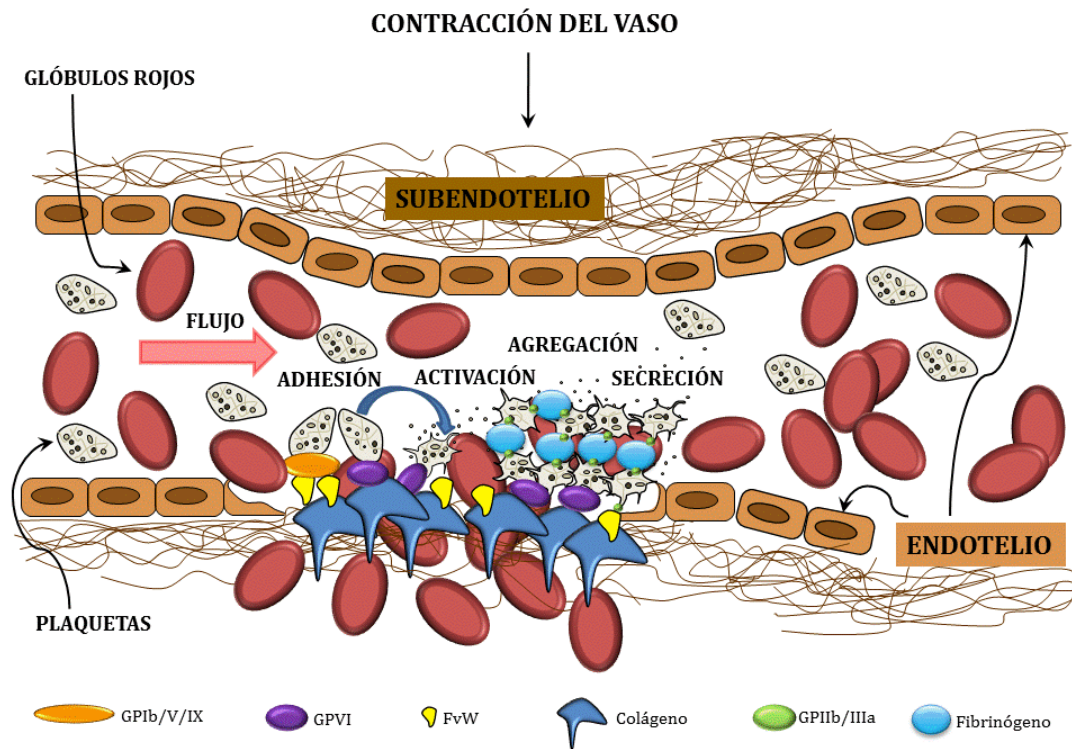


Figura 5. **Representación de los principales procesos que ocurren en la hemostasia primaria.** Espasmo vascular reflejo, adhesión de las plaquetas circulantes al colágeno y al factor von Willebrand (FvW) de la matriz subendotelial, activación plaquetaria, secreción de factores plaquetarios estimulantes (TXA<sub>2</sub> y ADP, entre otros) y la agregación plaquetaria en la que participan moléculas de fibrinógeno plasmático. Todos estos mecanismos permiten la formación de un tapón hemostático primario.

Durante todos estos procesos se produce un cambio de forma de la plaqueta, que pasa de la discoidal a la esférica, y desarrolla pseudópodos.

En la señalización “*inside out*” antes mencionada participan las proteínas G y las tirosina quinasas que promueven la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual pone en marcha el ciclo del fosfoinositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) que activa la salida de Ca<sup>2+</sup> de sus depósitos intracelulares al citoplasma. El Ca<sup>2+</sup> estimula a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) la cual libera ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana. Sobre el AA actúa la enzima ciclooxygenasa (COX) formándose una serie de prostaglandinas intermedias que al final producen dos prostanoides de importancia: TXA<sub>2</sub> en la plaqueta (potente agregante plaquetario y vasoconstrictor) y prostaciclina o prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) en la pared vascular (potente antiagregante plaquetario y vasodilatador). Por otra

parte la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la externalización del receptor de fibrinógeno, la contracción plaquetaria y la liberación del contenido de sus gránulos [115, 116], y activa la fase plasmática de la coagulación ( $\text{Ca}^{2+}$ , factores de la coagulación, etc.) (Figura 6).

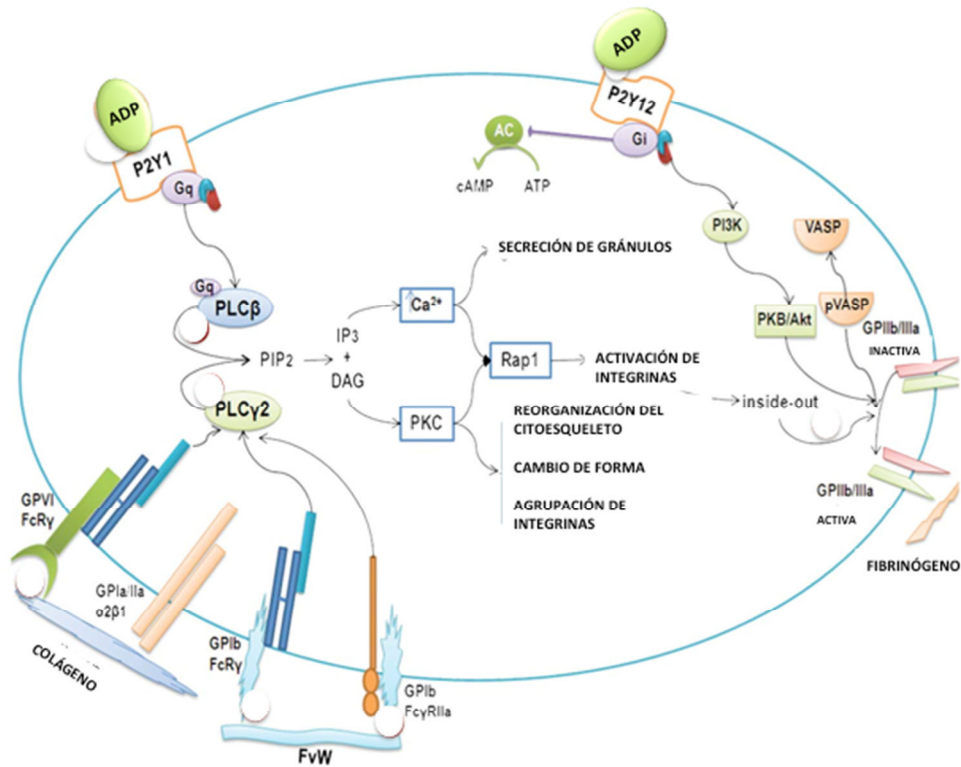


Figura 6. Esquema que representa la activación de las plaquetas

Paralelamente existen mecanismos inhibidores de la función plaquetaria. La adenosina y la prostaciclina activan la adenilciclasa, la cual forma adenosin monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ). Por otra parte, el óxido nítrico activa directamente la guanilil ciclase, que produce guanósín-monofosfato cíclico ( $\text{GMP}_c$ ). Tanto el  $\text{AMP}_c$  como el  $\text{GMP}_c$  activan los mecanismos de transporte de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en sus depósitos intracelulares, por lo que evitan la liberación granular y por consiguiente la activación trombocitaria.

La unión del fibrinógeno a su receptor inicia un proceso de señalización “*outside-in*” que genera una cascada de sucesos tales como el agrupamiento de las integrinas y la formación de estructuras conocidas como contactos focales. Estos ensamblajes proteicos

tienen un importante papel en la modulación de la adhesión celular, en la secreción y en la inducción de los cambios morfológicos implicados en la extensión y locomoción celular.

El tapón hemostático primario formado es inestable y debe ser fortalecido para que detenga eficazmente la hemorragia. El fortalecimiento del coágulo se logra a través de la hemostasia secundaria mediante la formación de una malla insoluble de fibrina.

Las plaquetas intervienen también en la hemostasia secundaria. Una vez activadas, su superficie sirve de anclaje a los distintos factores de coagulación al exponer fosfolípidos cargados negativamente. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma causa, a través de la flipasa, una asimetría de los fosfolípidos de membrana, exponiendo fundamentalmente PS. Estos fosfolípidos aniónicos permiten el ensamblado de los distintos factores de la coagulación que favorecen la generación de trombina, siendo a la vez esta última, un importante inductor de la activación plaquetaria [117].

#### **1.2.1.4 Micropartículas**

Las micropartículas (MPs) son vesículas formadas por PLs y proteínas cuyo tamaño varía de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las más frecuentes son las derivadas de plaquetas (70-90%) aunque pueden proceder también de otros tipos celulares: hematíes, neutrófilos, monocitos, linfocitos y células endoteliales.

En su membrana se encuentran PLs aniónicos y proteínas constitutivas, y en su interior proteínas correspondientes a su estirpe celular y microRNAs. No poseen núcleo ni capacidad de síntesis proteica pero sí tienen citoesqueleto. En ocasiones, MPs de distintos orígenes pueden fusionarse y producir MPs de características mixtas. Todas estas circunstancias hacen que las MPs sean importantes mediadores de señalización intercelular (Figura 7).

Las MPs circulantes pueden aumentar tanto en estados fisiológicos (la respuesta inmune, la hemostasia y el embarazo) como en patológicos (la trombosis, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o las infecciones) [118].

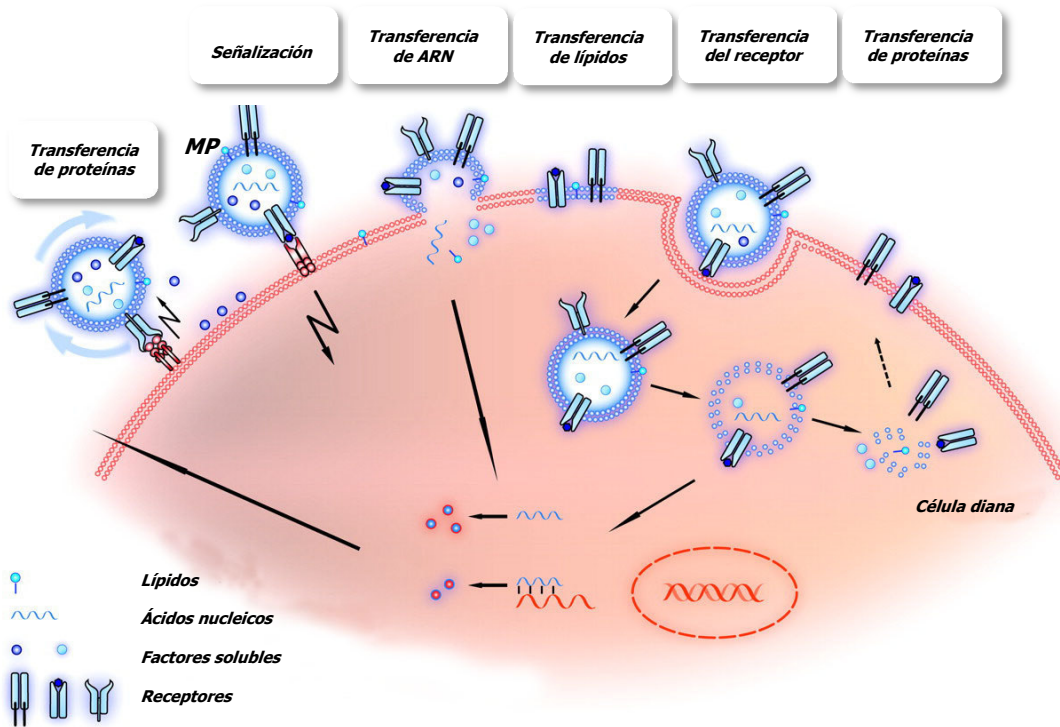


Figura 7. **Micropartículas (MPs) como mediadores de señalización.** Factores solubles liberados por MPs pueden dirigirse hacia las células e interactuar con moléculas de la membrana, a través de las cuales se producirán respuestas específicas en la célula diana. Las MPs pueden transferir más componentes de la membrana (como lípidos), ácidos nucleicos o receptores a la célula diana, a través de un proceso de internalización celular o por fusión en la membrana. Adaptada de Mause F. *et al.* *Circulation Research*, 2010. 107: 1047-1057.

La formación de MPs sucede durante la activación celular o en otros procesos celulares como la apoptosis. En condiciones normales, la membrana celular es asimétrica en cuanto a la composición y distribución de los PLs de sus capas interna y externa. En la capa más externa se sitúan la fosfatidilcolina y la esfingomiolina, mientras que la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina están presentes en la capa interna. Esta distribución asimétrica se mantiene gracias a tres sistemas enzimáticos: el de la flipasa, la flopasa y la escramblasa. En condiciones de reposo sólo se encuentra activa la flipasa, pero cuando se produce la activación de la célula o durante los procesos de apoptosis, se libera calcio del retículo endoplásmico, inactivándose la flipasa y activándose la flopasa y la escramblasa, con lo que se pierde la asimetría de la membrana (Figura 8).

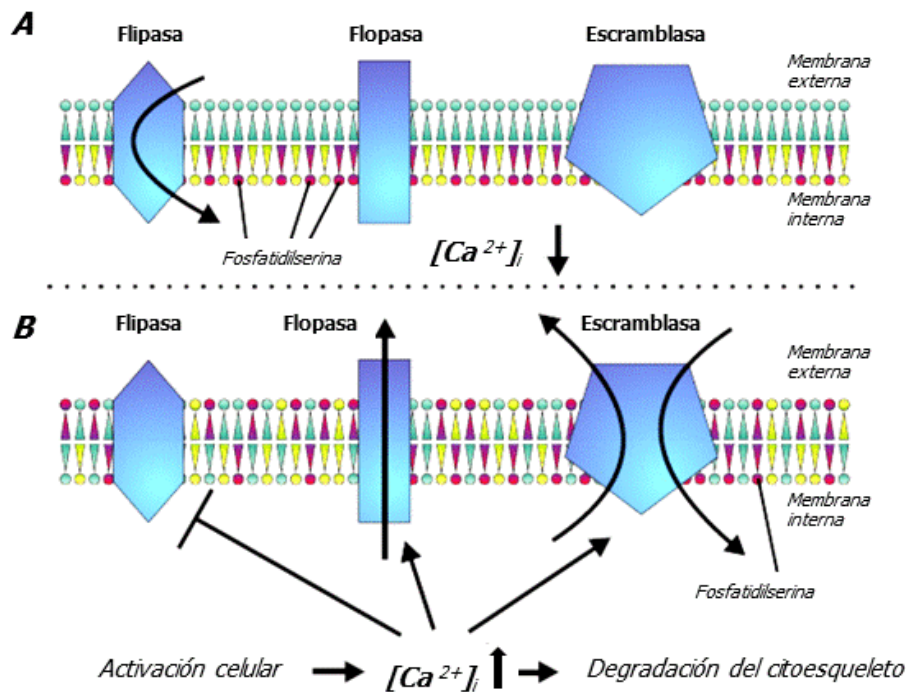


Figura 8. **Sistemas implicados en el mantenimiento de la membrana plaquetaria.** La distribución asimétrica de los fosfolípidos de membrana se mantiene por tres sistemas enzimáticos: flipasa, flopasa y escramblasa. A) La célula en reposo se caracteriza por una baja concentración de calcio citoplasmático y activación de la flipasa. B) La formación de MP's se asocia con la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. Esto se debe a la exposición de fosfolípidos en la membrana externa como consecuencia de la activación de flopasa y escramblasa, así como de la inhibición de la flipasa al aumentar la concentración de calcio intracelular. Adaptada de Burnier L *et al.* Thromb Haemost, 2009. 101: 439-451.

Además el calcio liberado activa dos enzimas, la calpaína y la gelsolina (esta última presente únicamente en las plaquetas) que hidrolizan los puentes de actina, debilitando su unión con las GP de membrana y formándose los ectosomas que darán lugar a las MP's. Así, el principal mecanismo de formación de MP's derivadas de plaquetas es calpaín-dependiente (Figura 9) [118].

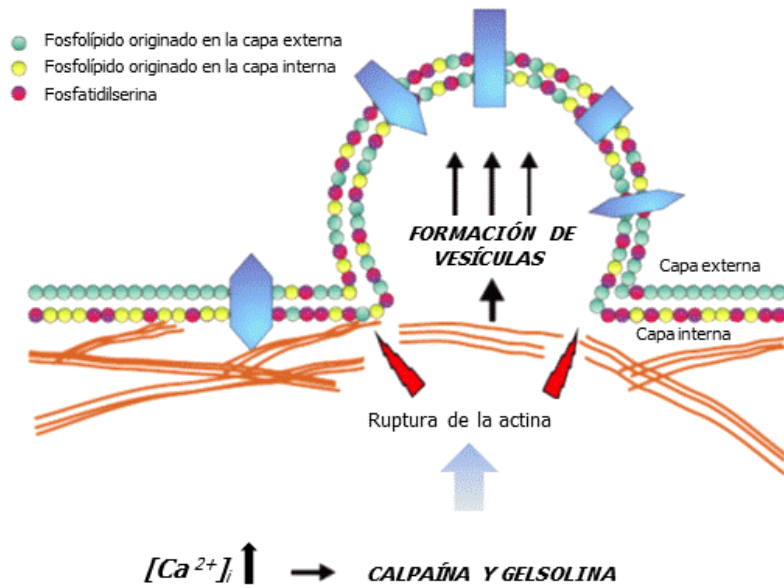


Figura 9. **Mecanismo de formación de micropartículas (MPs).** En la figura se muestra la formación de MPs, proceso que se inicia con la pérdida de asimetría en la membrana de la plaqueta y la posterior liberación de calcio que activa dos enzimas, calpaína y gelsolina, las cuales hidrolizan los puentes de actina, formándose los ectosomas que dan lugar finalmente a las MPs. Adaptada de Burnier L *et al.* Thromb Haemost, 2009. 101: 439-451.

Aproximadamente el 25% de la actividad procoagulante de la sangre se debe a las MPs derivadas de las plaquetas. La capacidad de las MPs para iniciar la coagulación se debe a que expresan en su superficie factor tisular (FT) y posteriormente, a la fusión de las MPs con las plaquetas activadas, proceso que requiere de la interacción del ligando glicoproteico 1 de la P-selectina (PSGL-1) de las MPs con la P-selectina plaquetaria. Además las MPs, a través de sus PLs aniónicos de membrana sirven de anclaje a diferentes factores de la coagulación [119, 120].

### 1.2.2 Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria se inicia a través de un proceso de activación proteolítica en cascada de zimógenos presentes en la sangre, que se activan consecutivamente unos a otros para dar lugar a proteínas con actividad enzimática. Durante este proceso también se produce la conversión de procofactores en cofactores enzimáticos, que aumentan la eficacia catalítica y favorecen el contacto de los complejos enzimáticos con la superficie de la membrana rica en PLs. La cascada de la coagulación permite la generación de trombina que transforma el fibrinógeno en fibrina lo que conduce, tras varios pasos, a la formación de un coágulo estable.

Tras la lesión del vaso, la coagulación es iniciada *in vivo* por el FT que se expresa en condiciones basales en las células del subendotelio, a través de una vía denominada vía extrínseca de la coagulación haciendo alusión a la localización extravascular del FT. Sin embargo, existen otras fuentes de FT que pueden activar la coagulación en determinadas circunstancias.

En una fase inicial de la coagulación o fase de iniciación, el FT expuesto en la superficie celular se une al factor VII activado (FVIIa) que en condiciones basales se encuentra en concentraciones muy bajas en el torrente sanguíneo. A continuación el complejo FVIIa-FT activa pequeñas cantidades de factor X (FX) y factor IX (FIX). El FX activado (FXa) activa pequeñas cantidades de factor V (FV) que conjuntamente con el FV activado (FVa) liberado por las plaquetas activadas (aproximadamente el 25% del FV proviene de las plaquetas) permite la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). Este complejo actúa sobre la protrombina (FII) para generar pequeñas cantidades de trombina (FIIa).

Durante este proceso, cualquier molécula de FXa que abandone la superficie celular en la que se ha formado, es inactivada rápidamente por el inhibidor de la vía del FT (TFPI, del inglés “*Tissue Factor Pathway Inhibitor*”) o por la antitrombina (AT) evitando la extensión de la coagulación a otras áreas no afectadas. La cantidad de trombina que se genera mediante este mecanismo no es suficiente para la formación de un coágulo estable, por lo que la producción de trombina tiene que ser amplificada.

Cuando la sangre entra en contacto con una superficie cargada negativamente se produce la activación de la coagulación. A esta vía de activación se le denomina vía de

activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación (Figura 10). El mecanismo de activación por contacto no es dependiente de calcio y en él participan dos zimógenos, el factor XII (FXII) y la precalicreína (PK) y un cofactor, el quinínogeno de alto peso molecular (HMWK). En el inicio de la activación por contacto, el FXII se une a una superficie cargada negativamente a través de dominios ricos en residuos de lisina con carga positiva [121, 122]. Esta unión causa un cambio conformacional en la molécula de FXII que conduce a una autoactivación del FXII [123, 124]. Este cambio conformacional también hace al FXII más susceptible a la acción proteolítica de la calicreína (K) [125]. El FXII activado (FXIIa) transforma a la PK unida a la superficie, en un complejo con el HMWK para producir K [126]. La K a su vez activa nuevas moléculas de FXII en un proceso denominado amplificación recíproca. También el FXIIa puede activar nuevas moléculas de FXII (autoamplificación) [127, 128]. Por último, el FXIIa activa al factor XI (FXI) que se encuentra unido a la superficie mediante un complejo formado con el HMWK. A partir de este paso, los mecanismos procoagulantes que participan en la obtención de trombina a través del factor XI activado (FXIa) no se conocen con exactitud. Se cree que en un paso posterior, el FXIa activa al FIX y el FIX activado (FIXa) obtenido por esta vía activa al FX que produciría a su vez pequeñas cantidades de trombina que darían paso a la fase de amplificación. Sin embargo, existen datos que indican que el FIXa posee una actividad catalítica muy limitada en ausencia de su cofactor, el factor VIII activado (FVIIIa), por lo que es poco probable que pueda producir suficiente FXa que permita la generación de trombina necesaria para la obtención de un tiempo de tromboplastina parcial activada normal, de entre 30-36 segundos [129, 130]. En contraste con lo anterior, existen datos más recientes que indican que el FXIa es capaz de activar pequeñas cantidades de FVIII y FV [131] lo que permitiría la formación de cantidades suficientes de los complejos tenasa (FIXa-FVIIIa) y protrombinasa (FXa-FVa) facilitando la obtención de importantes cantidades de trombina que dieran paso a la fase de amplificación.



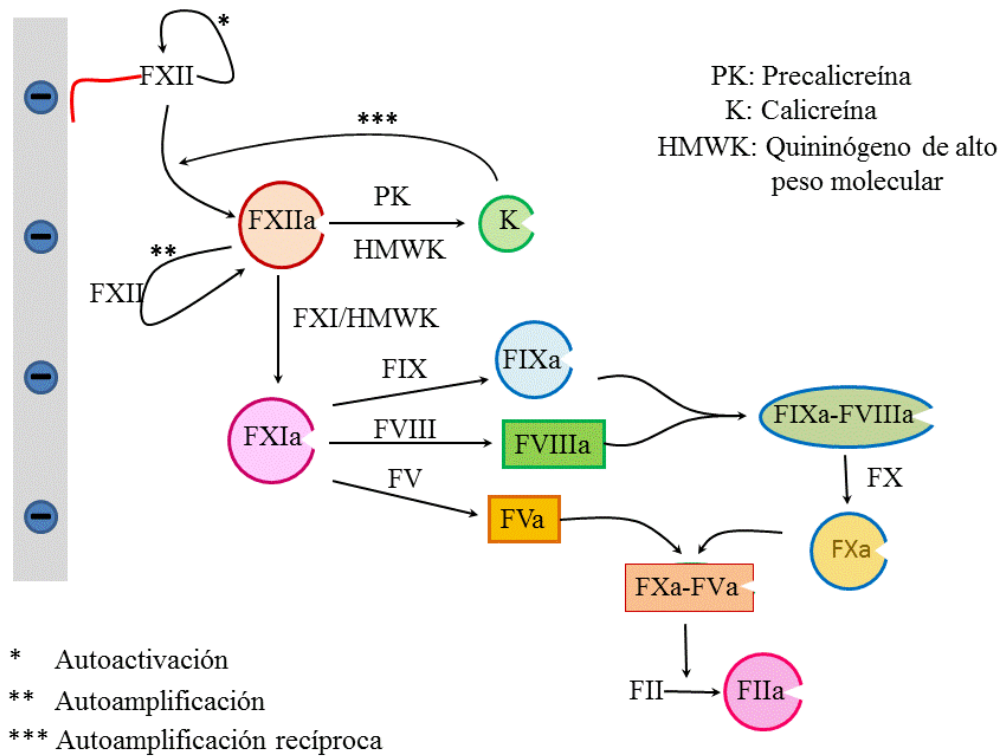


Figura 10. Representación esquemática de los mecanismos que participan en la vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación

En la fase de amplificación (Figura 11) las pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de iniciación, estimulan a nuevas plaquetas que llegan a través del torrente sanguíneo al sitio de la lesión y activan en la superficie de éstas, pequeñas cantidades de FV, FVIII y FXI. La activación del FVIII libera FVW del complejo FVIII-FVW que contribuye a la activación y reclutamiento de plaquetas a la zona afectada. Las plaquetas activadas ofrecen en el sitio de la lesión una superficie procoagulante que permitirá la generación de altas concentraciones de trombina, imprescindibles para la formación de un tapón hemostático estable durante la fase de propagación.

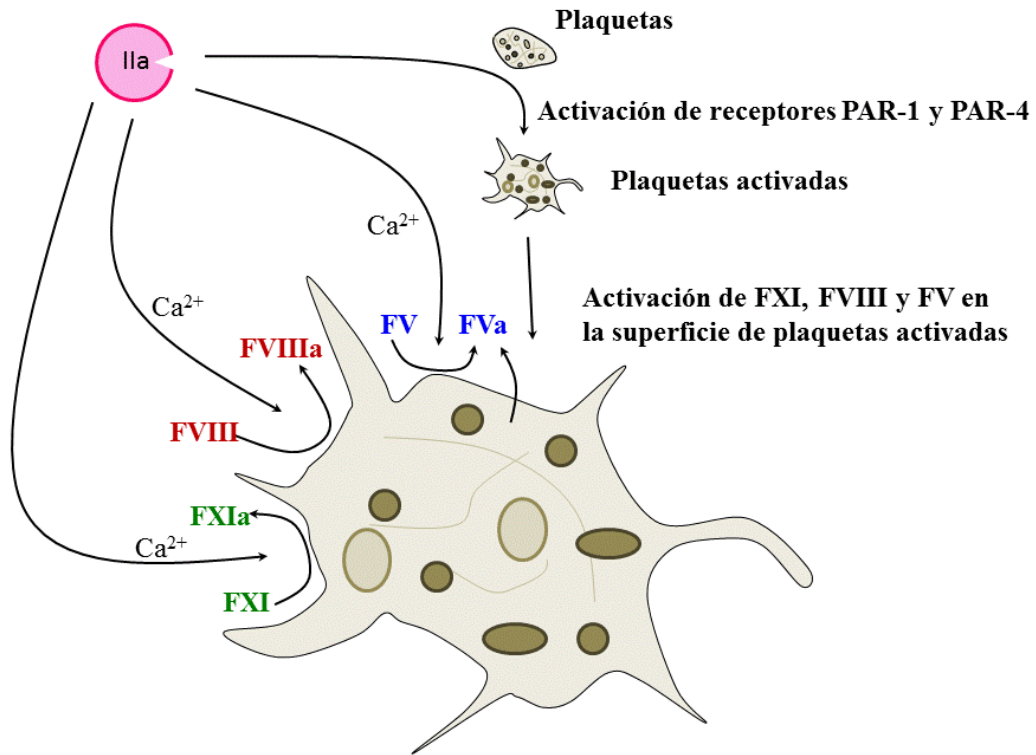


Figura 11. Fase de amplificación de la coagulación

En la fase de propagación (Figura 12) se establece un sistema de retroalimentación positiva que conduce a la obtención de concentraciones elevadas de trombina (explosión de trombina). En un inicio, las incipientes cantidades de FIXa y FVIIIa originadas en las fases anteriores se asocian en la superficie de las plaquetas activadas con la participación de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  para dar lugar al complejo tenasa (FIXa-FVIIIa) que genera concentraciones altas de FXa. El FXa originado se une a su vez al FVa en la superficie de plaquetas activadas, también con la participación de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , para formar el complejo protrombinasa (FXa-FVa) que dará lugar a más moléculas de trombina. La trombina a su vez actúa sobre nuevas moléculas de FX, FV, FIX y FVIII para generar en la superficie plaquetaria más FXa, FVa, FIXa y FVIIIa, cerrando el mecanismo de retroalimentación positiva.

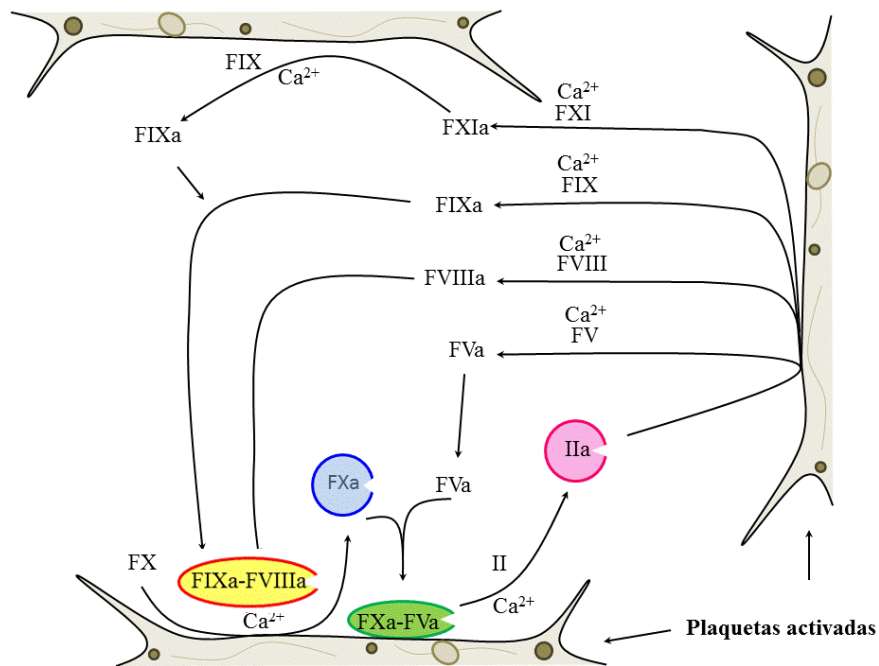


Figura 12. Fase de propagación de la coagulación

La trombina generada, el fibrinógeno y el factor XIII (FXIII) son las moléculas principales de la etapa final de la coagulación [132]. En un primer paso hacia la formación de una malla insoluble de fibrina, la trombina actúa sobre el fibrinógeno mediante proteólisis parcial liberando al fibrinopéptido A y al fibrinopéptido B. Esto conduce a la generación de moléculas de fibrina que polimerizan espontáneamente mediante enlaces no covalentes. En este punto, es interesante destacar que la trombina tiene un sitio de unión a la fibrina y su unión a ella le protege de sus inhibidores naturales, a la vez que conserva su actividad catalítica. Esto contribuye a mantener un potencial procoagulante en las zonas adyacentes a las fibras de fibrina en formación, favoreciendo el fortalecimiento del coágulo.

Debido a que la polimerización espontánea de la fibrina se produce mediante enlaces no covalentes, es necesaria la estabilización de la estructura. Esto se logra a través de la participación del FXIII cuya función catalítica es activada por la trombina [133]. El FXIII activado (FXIIIa) produce un entrecruzamiento entre las diferentes fibras poliméricas de fibrina mediante enlaces covalentes, lo que permite la obtención de una malla estable de fibrina [134].

La retracción del coágulo producida gracias a la participación del sistema contráctil de la plaqueta y a la interacción entre la GPIIb/IIIa presente en la superficie plaquetaria y los polímeros de fibrina, contribuye a la impermeabilización del coágulo lo que aumenta su resistencia al flujo sanguíneo.

### **1.2.3 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia**

#### **1.2.3.1 Trombinografía automática calibrada**

La trombinografía automática calibrada (CAT) es un método fluorimétrico desarrollado por Hemker *et al.* [135-137] que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación.

En este ensayo se añade al plasma un sustrato fluorogénico específico de la trombina, que al ser escindido por ella libera un producto fluorescente. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina.

Una de las ventajas más importantes del método fluorimétrico es que no se afecta por la turbidez de la muestra. Sin embargo, este test se puede afectar por numerosos factores tales como el efecto del filtro interno (absorción y emisión de fluorescencia por las propias moléculas que la emiten), el tiempo de uso de la lámpara emisora de la radiación excitante y la capacidad fluorogénica individual del plasma del paciente. También durante el transcurso de la determinación, un 30-40% del sustrato fluorogénico es consumido, lo que afecta el cálculo de la concentración de trombina. Para corregir estos factores que pueden afectar la determinación de la producción de trombina el método incluye la medición en paralelo de la generación de trombina en pocillos que contienen la muestra problema y una concentración conocida del complejo alfa2-macroglobulina/trombina. Este complejo puede escindir el sustrato fluorogénico, pero no es capaz de actuar sobre ninguno de los sustratos de la trombina.

Los parámetros que se obtienen en el test son (Figura 13):

*Tiempo de latencia* (TL) es el tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina. El *tiempo al pico* (TAP) es el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina a la *altura del pico* (AP). El *potencial endógeno de trombina* (ETP) representa la capacidad máxima de generación de trombina vs. el tiempo. Todos los parámetros son calculados de forma automática por el programa Thrombinoscope de Thrombinoscope BV (Maastricht, Holanda). El *índice de velocidad* (IV) permite calcular la velocidad con la que se genera la trombina durante el ensayo. Se puede obtener a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{AP}{(TAP - TL)}$$

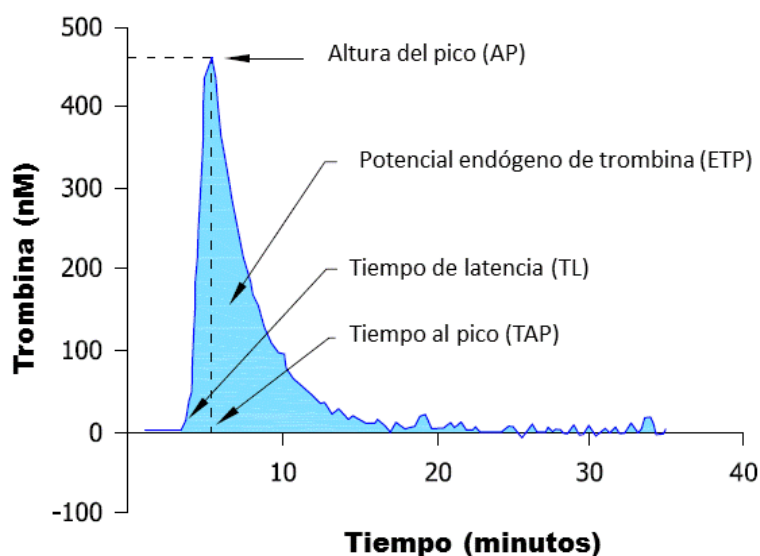


Figura 13. Ejemplo del trazado que se obtiene en la trombinografía automática calibrada (CAT).

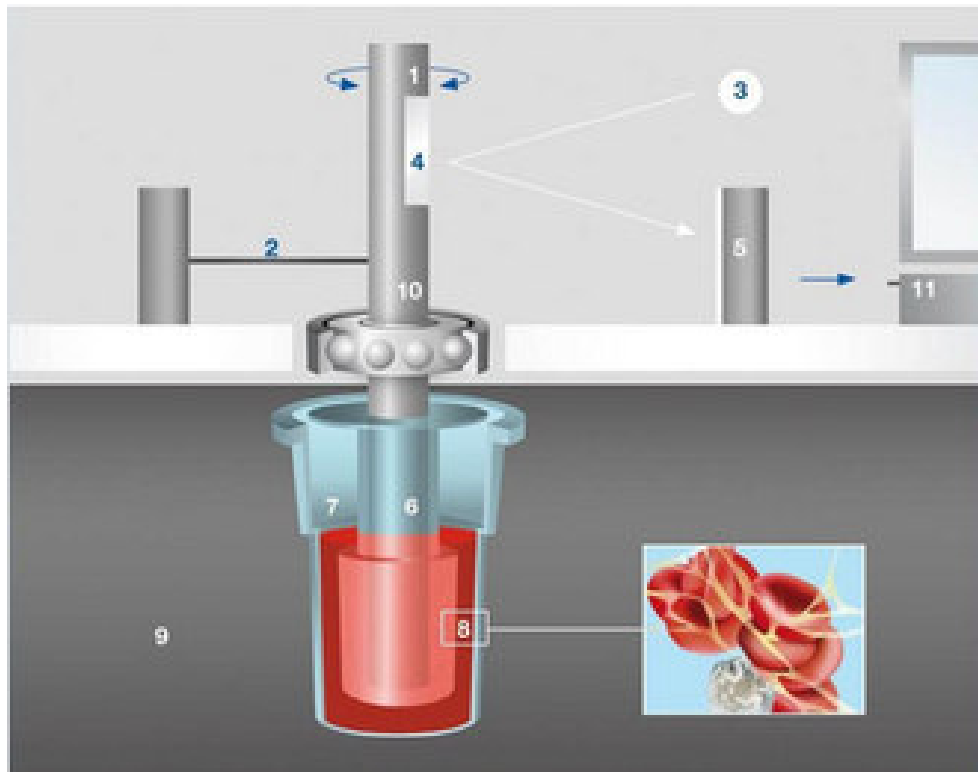
Se representa el *tiempo de latencia* (TL) (minutos) definido por el tiempo que transcurre desde el comienzo del test hasta el momento de la generación de 10 nM de trombina, la *altura del pico* (AP) (nM) definido por la máxima concentración de trombina alcanzada, el *tiempo al pico* (TAP) (minutos) o tiempo que transcurre desde el inicio del test hasta la obtención de la concentración máxima de trombina, y el *potencial endógeno de trombina* (ETP) (nM x minutos) (zona coloreada en azul) que representa la cantidad total de trombina generada durante el transcurso del test.

### **1.2.3.2 Tromboelastometría rotacional (ROTEM®)**

La tromboelastometría rotacional (ROTEM®) es un método de laboratorio que permite el estudio cinético de la formación del coágulo. El ensayo se realiza con sangre completa anticoagulada con citrato de sodio y analiza el cambio en las propiedades viscoelásticas de la sangre a medida que se produce la formación del coágulo.

El test permite evaluar de una forma global la coagulación del paciente, ya que no determina los niveles de una molécula en concreto sino que evalúa el producto de la interacción entre todos los factores de la coagulación, sus inhibidores y el componente celular (plaquetas, eritrocitos y leucocitos). Por otro lado, el ROTEM® es una técnica muy versátil lo que la hace útil en la evaluación del efecto de fármacos con actividad procoagulante o anticoagulante.

En este método, la sangre y los reactivos se disponen en una cubeta de plástico que se acopla a una pieza metálica alargada o perno que rota sobre su eje. A medida que transcurre el test, el dispositivo registra la resistencia a la rotación que se produce como consecuencia de la formación del coágulo (Figura 14).



- |                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1. Eje oscilante                 | 7. Cubeta con muestra de sangre |
| 2. Brazo del soporte             | 8. Agregados fibrina/plaquetas  |
| 3. Haz de luz                    | 9. Soporte termostatzado        |
| 4. Ventana colectora de la señal | 10. Cojinete transmisor         |
| 5. Detector (cámara eléctrica)   | 11. Ordenador                   |
| 6. Pin sensor del movimiento     |                                 |

Figura 14. **Representación de las partes fundamentales del tromboelastómetro y su mecanismo de funcionamiento.** La sangre y los reactivos son colocados en una cubeta de plástico formada por dos partes que se acoplan entre sí. Una parte de la cubeta queda fija dentro de un soporte termostatzado y la otra se acopla a un perno oscilante. Una vez acoplados, entre el perno y la cubeta se crea un espacio de 1 mm donde se aloja la sangre y los reactivos. A medida que comienza el proceso de coagulación, el movimiento del perno disminuye y la resistencia mecánica se convierte en los diferentes parámetros que caracterizan la cinética de la formación y la lisis del coágulo. Adaptado a partir de <http://www.rottem.de/en/methodology/>

Los parámetros que más se utilizan para caracterizar la formación del coágulo son el tiempo de coagulación (CT) (medido en segundos) definido como el tiempo que transcurre entre el comienzo del test y el inicio de la formación del coágulo (2 mm de amplitud en el eje “y” del gráfico), el tiempo de formación del coágulo (CFT, en segundos); definido por el tiempo que transcurre desde el CT hasta la obtención de una amplitud de 20 mm; el ángulo  $\alpha$  (en grados) que se calcula a partir de la tangente a la curva cuando la amplitud es de 2 mm y la firmeza máxima del coágulo (MCF, en mm), definida por la amplitud máxima obtenida (Figura 15).

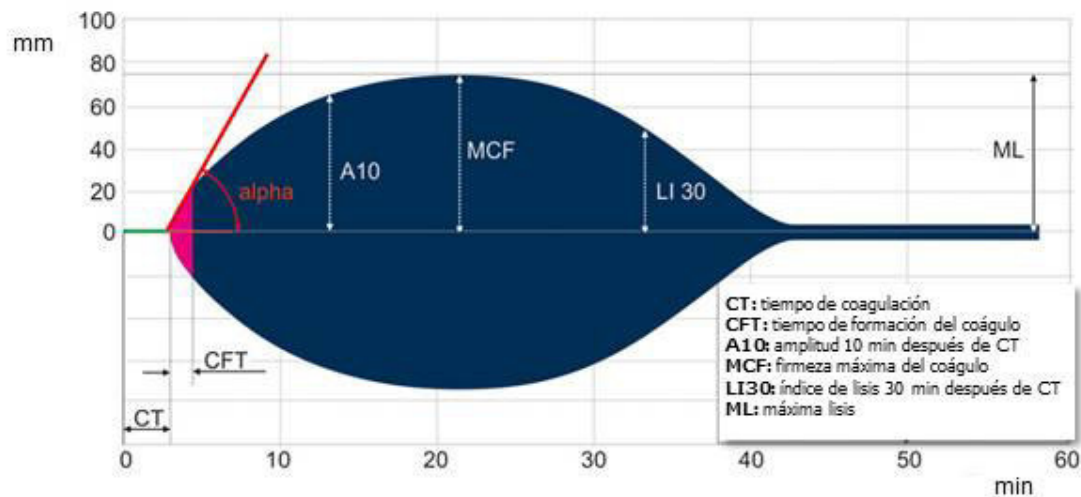


Figura 15. Representación de un tromboelastograma con los parámetros más utilizados

El CT depende fundamentalmente de los niveles de los factores de la coagulación y sus inhibidores, por lo que una alteración en este parámetro indicaría la existencia de cantidades anormales de factores de la coagulación, de sus inhibidores o la presencia de algún contaminante en la muestra.

Tanto el CFT como el ángulo  $\alpha$  describen la velocidad de formación del coágulo. Estos parámetros, al igual que el MCF, son sensibles en gran medida a alteraciones en la polimerización de fibrina o en la fibrinólisis, a la presencia de trombocitopenia o a alteraciones en la función plaquetaria.



Existen diferentes pruebas para evaluar la hemostasia mediante el ROTEM<sup>®</sup>:

Test NATEM: evalúa la coagulación tras la recalcificación del plasma sin agregar un activador y es muy sensible a cambios en el balance del mecanismo de coagulación [138].

Test INTEM: evalúa principalmente la vía intrínseca de la coagulación. En este test, el activador de la coagulación es una solución que contiene ácido elágico y fosfolípidos (tromboplastina parcial de cerebro de conejo). El ácido elágico es un polifenol que al pH del test se encuentra cargado negativamente, lo que produce una activación moderada y controlada de la fase de contacto. Este test es sensible a variaciones en los niveles de los factores de la coagulación, a alteraciones en la función plaquetaria y a la polimerización de la fibrina, así como a defectos en los mecanismos de la fibrinólisis. El test también es sensible a la presencia de anticoagulantes tales como la heparina, la hirudina, el argatroban y otros inhibidores de la trombina.

Test EXTEM: en este caso, la solución activadora de la coagulación contiene FT recombinante por lo que el ensayo evalúa principalmente la vía extrínseca de la coagulación. Por ello, el test es sensible a deficiencias en los niveles de FVIII, FIX y FXI. Al igual que el test INTEM, este test permite evaluar la vía común de la cascada de la coagulación y se afecta por alteraciones en los niveles de fibrinógeno y la polimerización de fibrina, defectos en la función plaquetaria y la disminución en el recuento de plaquetas. También permite detectar con mayor facilidad la presencia de un estado hiperfibrinolítico.

Test FIBTEM: se realiza una activación de la vía extrínseca de la coagulación en presencia de citocalasina D, un potente inhibidor de los elementos contráctiles de la plaqueta por lo que los resultados del test dependen fundamentalmente de los niveles de fibrinógeno y de los factores de la coagulación.

### **1.3 Apoptosis de las plaquetas**

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico que regula la vida celular, en respuesta a diferentes estímulos, teniendo como objetivo eliminar las células dañadas o no deseadas.

En un principio se pensó que este proceso sólo ocurría en células con núcleo, pero diferentes trabajos demuestran que también se produce en células anucleadas como las plaquetas, en las que juega un papel esencial en su formación y liberación [139].

El mecanismo central de la apoptosis consiste en la activación de una familia de proteasas denominadas caspasas. Estas proteasas se activan jerárquicamente, de forma que las caspasas iniciadoras proteolizan y activan a las caspasas efectoras que a su vez proteolizan a otras proteínas, produciendo los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis. La activación de las caspasas iniciadoras se produce principalmente por dos vías: la vía extrínseca y la vía mitocondrial o intrínseca (Figura 16) [140].

La vía extrínseca se inicia por unión de ligandos extracelulares (como TNF- $\alpha$ , FasL o TRAIL) a sus receptores de la superficie celular (TNFR1, Fas, DR4 o DR5). Esta unión induce la activación de la caspasa 8, que a su vez actúa sobre las caspasas efectoras (caspasas 3 y 7). Además, la caspasa 8 proteoliza a BID, y la forma proteolizada tBID es capaz de inducir la salida de factores mitocondriales proapoptóticos [139].

La vía intrínseca o mitocondrial se desencadena como respuesta a una gran variedad de estímulos, internos o externos, y está regulado por proteínas de la familia BCL-2 que controlan la salida de algunas proteínas del espacio intermembranal mitocondrial al citosol. Una de estas proteínas es el citocromo c, que una vez en el citosol se une a la proteína Apaf-1 induciendo su oligomerización junto a la caspasa 9 y la formación de un complejo heptamérico, el apoptosoma, donde se activa la caspasa 9, que a su vez activa las caspasas efectoras. Las proteínas de la familia de BCL-2 se asocian entre sí a través de sus dominios BH para formar homo y/o heterocomplejos que tienen distintos papeles en el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la salida del citocromo c. Las proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 o BCL-X<sub>L</sub>, inhiben a

BAX/BAK. Finalmente, las proteínas proapoptóticas con un solo dominio BH3 inhiben a las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 [141].

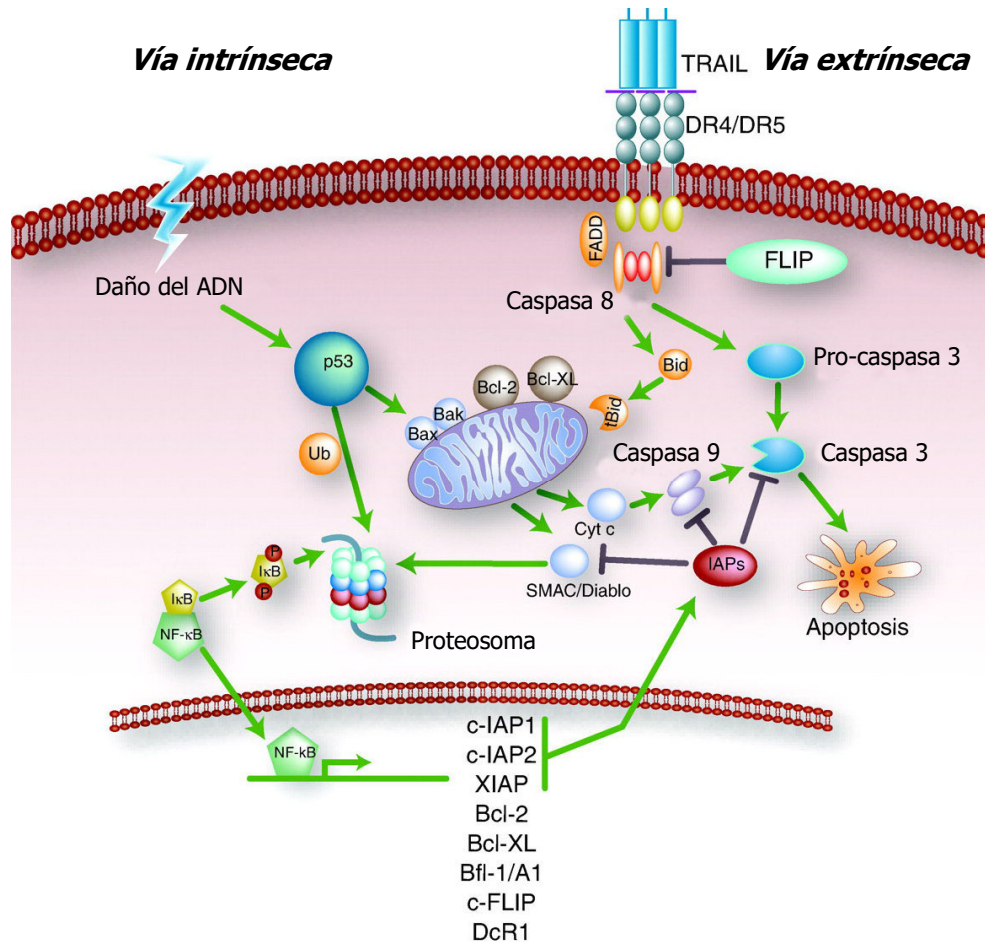


Figura 16. Representación de las dos vías de activación de la apoptosis en células nucleadas. Adaptada de Vries E.G. Clin Cancer Res, 2006. 12(8): 2390-3.

En el caso de las plaquetas, un almacenamiento prolongado de las mismas, los anticuerpos anti plaquetas, las fuerzas reológicas en estados de flujo alto y diferentes estímulos celulares externos como los ionóforos de calcio pueden inducir apoptosis. Estas condiciones conducen a cambios estructurales en la membrana: pérdida de ácido siálico y alteraciones en la distribución de fosfolípidos, despolarización, expresión de proteínas proapoptóticas (proteínas de la familia BCL-2), activación de las caspasas 3 y 9, exposición de fosfatidilserina y formación de MPs derivadas de las plaquetas [141].

En los últimos años, se ha hecho evidente que la vía intrínseca de la apoptosis juega un papel esencial en la supervivencia de las plaquetas. De manera que las plaquetas que no se consumen en el proceso hemostático están destinadas a morir por la vía de BAK y BAX [142]. También se ha investigado el papel de la vía intrínseca de la apoptosis en los megacariocitos y varios grupos han examinado el papel de las proteínas de la familia BCL-2 y de las caspasas en la regulación de la vida de los megacariocitos. Igualmente se ha demostrado que los megacariocitos poseen la vía extrínseca de la apoptosis Fas ligando-inducible (Figura 17) [139].

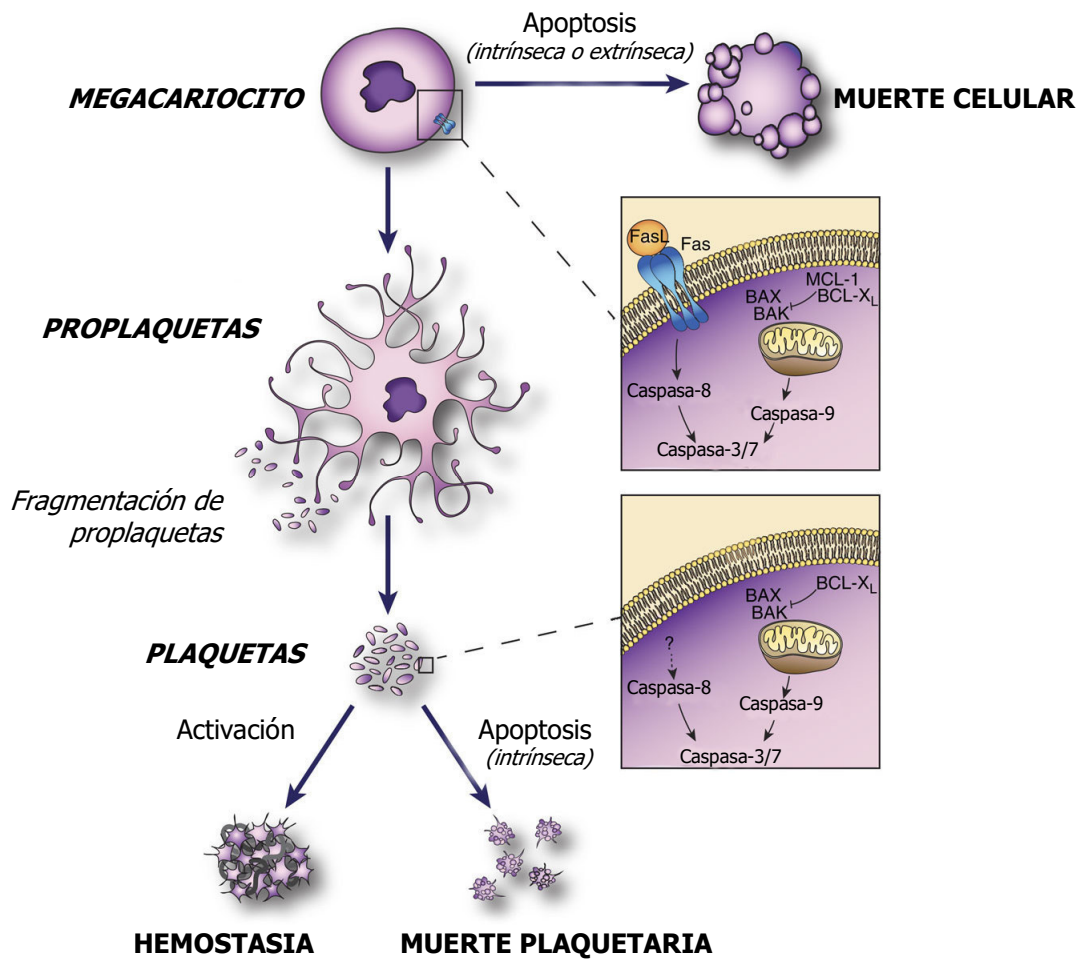


Figura 17. **Papel de la apoptosis en megacariocitos y plaquetas.** Adaptada de Josefsson E.C. Nature Communications, 2014. 5: 3455.

## **2. HIPÓTESIS**



1. Los pacientes con SMD pueden presentar trombocitopenia grave, considerándose ésta un factor pronóstico adverso tanto en la SG como en la evolución a LMA en pacientes con IPSS bajo e intermedio-1 [83]. La trombocitopenia en estos pacientes puede deberse no sólo a una alteración a nivel de la producción de las plaquetas a partir de los megacariocitos sino también a un incremento de la apoptosis de las mismas.
2. Algunos pacientes con SMD y trombocitopenia moderada o leve presentan clínica hemorrágica. Esto podría deberse a una alteración funcional a nivel de las plaquetas.
3. Por el contrario, en otros pacientes con SMD y marcada trombocitopenia, la clínica hemorrágica es escasa. Esto podría explicarse por la existencia de mecanismos compensatorios de la tendencia hemorrágica en estos pacientes.





## **3. OBJETIVOS**



1. Caracterizar la regulación de la producción de plaquetas por trombopoyetina estudiando la relación entre el número de plaquetas, los niveles plasmáticos de trombopoyetina y la producción de plaquetas inmaduras en los pacientes con SMD.
2. Evaluar la capacidad de activación de las plaquetas en pacientes con SMD.
3. Caracterizar la apoptosis en las plaquetas de los pacientes con SMD.
4. Evaluar la existencia de mecanismos hemostáticos compensatorios de la trombocitopenia y de la disfunción plaquetaria en los pacientes con SMD.



# **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4.1. Descripción de los pacientes incluidos en el estudio**

Participaron en el estudio 75 pacientes diagnosticados de SMD, 36% mujeres, con una mediana de edad de 77 años (rango 41-93). Como controles se utilizaron muestras de 68 donantes sanos, 29% mujeres con una mediana de edad de 52 años (rango 20-76). La diferencia de edad entre los pacientes a estudio y los donantes no resultó estadísticamente significativa.

Todos los pacientes fueron estratificados de acuerdo con el recuento de plaquetas y el IPSS. Se definió trombocitopenia a un recuento de plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/L$  y trombocitosis a recuentos superiores a  $325 \times 10^9/L$ . La masa plaquetaria (volumen plaquetario medio [VPM] x recuento de plaquetas) se clasificó como baja (menor de 0.6 mL/L), intermedia (0.6-1.2 mL/L) o alta (mayor de 1.2 mL/L).

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz. La investigación se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y se solicitó consentimiento informado tanto a los pacientes como a los donantes para participar en el estudio. Se garantizó manejar la información respetando la legislación española sobre códigos éticos de conducta (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; y Ley 8/2001, del 13 de Julio, de protección de datos de carácter personal en la Comunidad de Madrid).

## **4.2. Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio**

### **4.2.1. Criterios de inclusión**

#### **▪ Pacientes**

- Pacientes diagnosticados de SMD según la clasificación de la OMS 2008.
- Edad  $\geq 18$  años.
- Pacientes que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma previa del consentimiento informado.

▪ **Controles sanos**

Sujetos con edad  $\geq 18$  años que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma previa del consentimiento informado.

**4.2.2. Criterios de exclusión comunes a pacientes y controles sanos**

- Tratamiento con anticoagulantes o medicamentos que puedan afectar la hemostasia tales como antagonistas de la vitamina K, heparina, antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales y fármacos antiplaquetarios.
- Haber sido diagnosticado de un trastorno de la coagulación o trombopatía.
- Niveles de creatinina  $\geq 2$  mg/dL.
- Niveles de aspartato-aminotransferasa (AST) y/o alanina-aminotransferasa (ALT)  $> 2$  veces el límite superior de la normalidad.
- Hipertensión arterial no controlada (tensión sistólica  $\geq 140$  mm Hg y/o la tensión diastólica  $\geq 90$  mm Hg).
- Hiperlipidemia.
- Enfermedad arterial coronaria o periférica.
- Transfusión de plaquetas en los 15 días previos a la extracción.

**4.3. Extracción y preparación de las muestras**

Las muestras se obtuvieron en las consultas de hematología del Hospital Universitario La Paz desde el año 2010 hasta el 2014, en los pacientes previamente diagnosticados de SMD, así como en los de nuevo diagnóstico.

Con el objeto de evitar la influencia de los ciclos circadianos en las variables estudiadas, la hora de extracción fue la misma para todos los sujetos del estudio (entre las 9 y las 10 horas de la mañana).

A cada paciente se le extrajeron por venopunción antecubital, 10 mL de sangre total: 7 mL se recogieron en tubos con citrato sódico 3.8% y 3 mL en tubos de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Vacutainer®, BD, Becton Dickinson and Company, Madrid, España).



El recuento celular y los niveles plasmáticos de TPO se determinaron en las muestras recogidas en EDTA. El resto de los ensayos se realizaron en las muestras de sangre extraídas con citrato sódico.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de sangre total (150 x g durante 20 minutos a 23°C).

Para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP) las muestras de sangre se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 minutos a 23°C. El plasma libre de plaquetas (PFP) se obtuvo sometiendo al PPP a una segunda centrifugación a 10.000 x g durante 2 minutos a 23°C. Las alícuotas de PPP y de PFP se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Para obtener plaquetas lavadas, un volumen correspondiente a los 2/3 superiores del PRP fueron centrifugados a 650 x g, durante 10 minutos a 23°C, después de la adición de una solución de ácido cítrico-dextrosa (citrato de sodio 85 mM, ácido cítrico 65 mM y glucosa 104 mM) en una proporción 1:10. A continuación, el sedimento fue resuspendido en un volumen similar de tampón HEPES (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl y 1 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7.4).

## **4.4 Análisis de las muestras**

### **4.4.1 Recuento celular**

El recuento celular de las muestras sanguíneas se realizó de manera automática con el Coulter Ac.T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, España).

### **4.4.2 Estudio de la activación plaquetaria**

La activación de las plaquetas se estudió en estado basal y después de un estímulo con diferentes agonistas.

Para esto el PRP se diluyó con tampón HEPES a una concentración 1:5. Alícuotas de 50 µL se incubaron con 100 µM del péptido activador del receptor de trombina 6 (TRAP, Bachem, Suiza) o con 20 µM de difosfato de adenosina (ADP, Sigma, Madrid, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se

añadió PAC1 (Becton Dickinson, Madrid, España), un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce sólo la forma activa del receptor de fibrinógeno o un mAb contra la P-selectina humana (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), ambos marcados con fluoresceína (FITC). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, las plaquetas se diluyeron con tampón HEPES y se realizó el análisis por CMF con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). El software utilizado fue el CellQuest Pro™ (BD Biosciences).

Para determinar el número de receptores de fibrinógeno existentes en la superficie plaquetaria, el PRP se diluyó 1:5 en un tampón fosfato salino (PBS) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con un mAb marcado con ficoeritrina dirigido contra la subunidad  $\alpha$ Ib (Biocytex, Marsella, Francia) o con un mAb marcado con FITC dirigido contra la subunidad  $\beta$ 3 del receptor de fibrinógeno (BD Pharmingen, Madrid, España). Tras la incubación, la muestra se diluyó de nuevo con PBS (1:6) y se analizó por CMF.

#### **4.4.3 Estudios con el PFA-100®**

El sistema PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona, España) mide el proceso de la hemostasia primaria y ayuda en la detección rápida de la disfunción plaquetaria. Se basa en un sistema de flujo sanguíneo ( $5000-6000\text{ s}^{-1}$ ) que simula el flujo arteriolar, mediante el paso de sangre total citratada a través de un orificio de  $150\text{ }\mu\text{m}$  de una membrana cubierta con agonistas: colágeno + ADP (ADP;  $50\text{ }\mu\text{g}$ ) (Col/ADP) o colágeno + epinefrina (EPI;  $10\text{ }\mu\text{g}$ ) (Col/EPI). El valor a medir es el tiempo que tarda en obturarse la membrana o tiempo de obturación (TO). Su resultado puede alterarse por la disminución del número de plaquetas, por lo que este análisis únicamente se realizó en aquellos pacientes con cifra de plaquetas  $>100 \times 10^9/\text{L}$ .

#### **4.4.4 Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas**

##### **4.4.4.1 Expresión de fosfatidilserina en la superficie plaquetaria**

Para la cuantificación de la expresión de fosfatidilserina (PS) en la superficie plaquetaria evaluamos la unión de anexina V marcada con FITC (Becton Dickinson, Madrid, España). Para esto añadimos a la muestra de plaquetas lavadas el tampón de

unión del kit de anexina V (10 mM HEPES, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4). A continuación, añadimos el reactivo anexina V-FITC. La muestra se analizó por CMF después de dejarla incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

#### 4.4.4.2 Medición de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9

Para el análisis de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 utilizamos un método que se basa en el uso de inhibidores de caspasas marcados con un fluorocromo (*fluorochrome-labeled inhibitors of caspases*, FLICA). Cada FLICA contiene tres dominios distintos funcionalmente: a) el dominio fluorocromo (carboxifluoresceína o fluoresceína, FAM), b) el dominio de reconocimiento de la caspasa que comprende un péptido de tres o cuatro aminoácidos (DEVD para las caspasas 3/7, LETD para la caspasa 8 y LEHD para la caspasa 9) y c) el dominio de unión covalente que consiste en cloro- o fluoro-metil cetona (FMK) que se une a la cisteína de la respectiva caspasa formando un enlace tiometil-cetona que inactiva irreversiblemente al enzima. FLICA penetra a través de la membrana plasmática de las células sin resultar tóxico para las mismas.

Para el estudio de la actividad de las caspasas utilizamos PRP diluido a una concentración 1:10 con un tampón salino isotónico HEPES enriquecido con calcio (150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Gly-Pro-Arg-Pro (Sigma), 2 mM HEPES, pH 7,4). La muestra se incubó durante 1 hora con las FLICAS específicas para las caspasas 3/7, 8 y 9 (Millipore, Madrid, España). Tras la incubación marcamos la población de las plaquetas con un mAb marcado con ficoeritrina dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb y se realizó el análisis por CMF.

#### 4.4.4.3 Análisis de las proteínas BAX, BAK, BCL-2 y BCL-X<sub>L</sub>

El contenido plaquetario de las proteínas proapoptóticas BAK y BAX y de las antiapoptóticas BCL-2 y BCL-X<sub>L</sub> se determinaron por Western Blot. Las plaquetas lavadas se resuspendieron en tampón Triton para su lisis (1% Triton X-100, 0.05% Tween- 20, 300 mM NaCl y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo en PBS) que contenía inhibidores de proteasas (Complete Mini®, EDTA free; Roche, Barcelona, España). Luego se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del

detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia de tipo semiseco, usando el sistema Trans-Blot® TurboTM de BioRad®. Las proteínas celulares fijadas en la membrana se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos contra BAK (sc-1035), BAX (sc-23959), BCL-2 (sc-492) y BCL-X<sub>L</sub> (sc-7122) todos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). A continuación, se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (BioRad, Madrid, España). La detección se realizó mediante un sistema de quimioluminiscencia y el análisis de los resultados se realizó mediante densitometría con el programa de software NIH (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). La carga de proteína fue monitorizada utilizando un anticuerpo anti-actina (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology Inc.).

#### **4.4.5 Determinación de los niveles de TPO en plasma**

La concentración de TPO plasmática se determinó en PFP obtenido de la sangre recogida en EDTA y se realizó con un kit comercial (ELISA, Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mediante la técnica de ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **4.4.6. Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas**

La medición de las plaquetas reticuladas la realizamos según el método previamente descrito por Hayashi *et al.* [143]. Las muestras de PRP se fijaron con formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendieron con PBS. A continuación incubamos 50  $\mu$ L de la muestra con 5  $\mu$ L de un mAb dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb marcado con ficoeritrina (Biocytex, Marsella, Francia) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente añadimos 600  $\mu$ L de PBS y 100  $\mu$ L de naranja de tiazol (Retic-Count®, BD, San Jose, CA, USA). Después de la incubación durante 2 horas, en la oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron por CMF (FACScan, BD Biosciences).

#### 4.4.7 Estudio de la capacidad procoagulante del plasma asociada a micropartículas

La actividad procoagulante asociada a los PLs o al contenido de FT de MPs se midió en muestras de PFP con dos kits diferentes de ZYMUPHEN (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits se basan en tests funcionales para medir la actividad procoagulante de las MPs presentes en el plasma humano a través de la generación de trombina y de FXa.

Para determinar la actividad procoagulante asociada a los PLs de las MPs, el PFP más calcio, FXa e inhibidores de la trombina se introducen en el pocillo de una microplaca recubierto con estreptavidina y anexina unida a biotina. Las MPs presentes en la muestra a estudiar se unen a la anexina-V por medio de los PLs. Posteriormente se añade protrombina purificada, FXa-FVa y calcio, que junto con los PLs aportados por las MPs permitirán el paso de protrombina a trombina que se une a un sustrato cromogénico. La reacción se para con ácido cítrico al 2% y posteriormente se mide la absorbancia o liberación de color a 405 nm (A405). La cantidad de trombina generada será proporcional a la cantidad de PLs contenidos en la muestra.

Para determinar la actividad procoagulante asociada al FT de las MPs, uno de los reactivos y las muestras se introducen en pocillos cubiertos con un mAb contra el dominio extracelular del FT humano. Las MPs se unen por medio del FT que contienen a los pocillos. Luego se agrega FVIIa que formando complejo con el FT activa al FX en la superficie de los PLs de las MPs en presencia de calcio. En una tercera etapa se agrega un sustrato para el FXa que al degradarse produce un compuesto amarillo. La absorbancia a 405 nm es directamente proporcional a la cantidad del FT presente en las MPs.

#### 4.4.8 Caracterización del origen celular de las micropartículas

La cuantificación e identificación del origen de las MPs se realizó en PFP por CMF. Para hacer la determinación se siguieron las recomendaciones del “*Scientific Subcommittees of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*” y fue necesario calibrar el citómetro con microesferas que permitieron establecer la ventana que incluía a las partículas menores

de 1 micra de diámetro. La identificación de las MPs se realizó según su tamaño y capacidad para unir FITC-anexina V.

Para identificar el origen celular se utilizaron anticuerpos monoclonales contra los antígenos específicos de los diferentes tipos celulares: plaquetas (CD41, Biocytex, Marseille, France), eritrocitos (CD235), monocitos (CD14), células endoteliales (CD31) y leucocitos (CD45), todos marcados con ficoeritrina (BD Biosciences, Madrid, España).

#### **4.4.9 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia**

##### **4.4.9.1 Trombinografía automática calibrada**

Para medir la generación de trombina se utilizó la trombinografía automática calibrada (*CAT, Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope*). El CAT es un método fluorimétrico que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación. Al plasma en estudio se añade un sustrato fluorogénico específico de la trombina que al ser escindido por ella libera un producto fluorescente. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina.

El CAT se realizó en PPP. Las muestras se descongelaron a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se añadieron 80 µL de la muestra en cada pocillo junto a 20 µL del reactivo *PPP-Reagent LOW (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda)* que contiene fosfolípidos (concentración final de 4 µM), FT (concentración final de 1pM) y 20 µL de una solución tampón compuesta por un sustrato específico de la trombina y CaCl<sub>2</sub> (solución FluCa Kit de *Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda*).

La generación de trombina se registró de forma continua con un fluorímetro Fluoroscan FL (*Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia*), con una excitación de 390 nm y emisión a 460 nm. Los valores de fluorescencia se convirtieron en actividad de trombina en función del tiempo con el programa específico *Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda)* versión 3.6. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

Con el CAT se evaluaron el tiempo de latencia (TL), el tiempo al pico (TAP), la altura del pico (AP) y el potencial endógeno de trombina (ETP). El índice de velocidad (IV) se calculó a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{AP}{(TAP - TL)}$$

Para determinar si existía resistencia a la proteína C se determinó el ETP en ausencia y presencia de trombomodulina.

#### **4.4.9.2 Tromboelastometría rotacional (ROTEM®)**

El ROTEM® se realizó en PRP ajustado a  $25 \times 10^9$  plaquetas/L que se mantuvo en reposo un mínimo de 30 minutos y un máximo de 1 hora antes de las determinaciones.

La cinética de la formación del coágulo se evaluó con el test NATEM® y los parámetros derivados de este test fueron: NATEM-CFT, NATEM-MCF y NATEM- $\alpha$ . Para la realización del test se añadieron en la cubeta de reacción: 300  $\mu$ L de PRP ajustado y 20  $\mu$ L de una solución de  $\text{CaCl}_2$  (0,2 M: reactivo NATEM®) para revertir el efecto anticoagulante del citrato de sodio.

#### **4.4.10 Método estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó por la unidad de biestadística del Hospital Universitario La Paz con el programa SPSS versión 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La comparación de múltiples grupos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) por el procedimiento de Dunn. La comparación de la media de dos grupos se realizó con el método estadístico U de Mann-Whitney. La existencia de correlación lineal entre los distintos parámetros cuantitativos estudiados se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson cuando la población seguía una distribución normal, y con el coeficiente de correlación de Spearman cuando la distribución no era normal.





## **5. RESULTADOS**



## 5.1 Pacientes incluidos

**Tabla 9.** Características de los pacientes incluidos en el estudio según su grupo de riesgo

		<i>IPSS-B</i>	<i>IPSS-I</i>	<i>IPSS-A</i>	
<b>Género</b>	<i>Varones</i>	27 (69.2%)	15 (55.6%)	6 (66.7%)	
	<i>Mujeres</i>	12 (30.8%)	12 (44.4%)	3 (33.3%)	
<b>Edad (años); mediana (rango)</b>		80 (41-93)	75 (53-88)	77 (55-91)	
<b>Clasificación SMD OMS 2008</b>	<i>CRDU</i>	8 (20.5%)	3 (11.6%)	0 (0%)	
	<i>ARS</i>	21 (53.8%)	1 (3.8%)	0 (0%)	
	<i>CRDM</i>	6 (15.4%)	13 (50%)	2 (20%)	
	<i>AREB-1</i>	0 (0%)	4 (15.3%)	4 (40%)	
	<i>AREB-2</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	
	<i>Del5q</i>	1 (2.6%)	0 (0%)	1 (10%)	
	<i>Inclasificable</i>	3 (7.7%)	5 (19.3%)	0 (0%)	
	<b>Hemoglobina</b>	<i>11.5-15.3 g/dL</i>	11 (28.2%)	6 (22.2%)	1 (11.1%)
		<i>&lt;11.5 g/dL</i>	28 (71.8%)	19 (70.4%)	8 (88.9%)
	<i>&gt;15.3 g/dL</i>	0 (0%)	2 (7.4%)	0 (0%)	
<b>Leucocitos</b>	<i>3.7-11.6 x 10<sup>3</sup>/μL</i>	28 (71.8%)	16 (59.3%)	2 (22.2%)	
	<i>&lt;3.7 x 10<sup>3</sup>/μL</i>	7 (17.9%)	9 (33.3%)	5 (55.6%)	
	<i>&gt;11.6 x 10<sup>3</sup>/μL</i>	4 (10.3%)	2 (7.4%)	2 (22.2%)	
<b>Nº plaquetas (x 10<sup>3</sup>/mL)</b>		283 ± 176	104 ± 119	92 ± 112	
<b>Volumen plaquetar (fl)</b>		9.4 ± 1,0	9.5 ± 1.5	9.9 ± 1.9	
<b>Masa plaquetar</b>	<i>0.5-1.2 mL/L</i>	5.4%	30.5%	40.0%	
	<i>&lt;0.6 mL/L</i>	5.4%	31.0%	40.0%	
	<i>&gt;1.2 mL/L</i>	89.2%	38.5%	30.0%	
<b>Transfusiones</b>	<i>No</i>	25 (64.1%)	10 (37.0%)	1 (11.1%)	
	<i>Si</i>	14 (35.9%)	17 (63.0%)	8 (88.9%)	

## 5.2 Recuento de células sanguíneas

Los SMD son un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos causados por anomalías clonales de la médula ósea con posible afectación de una o más líneas celulares. En la figura 18 se observa que los pacientes con SMD, independientemente de su clasificación por riesgo según el IPSS, presentan una disminución en el número de eritrocitos y de su contenido en hemoglobina, con un ligero aumento en su volumen.

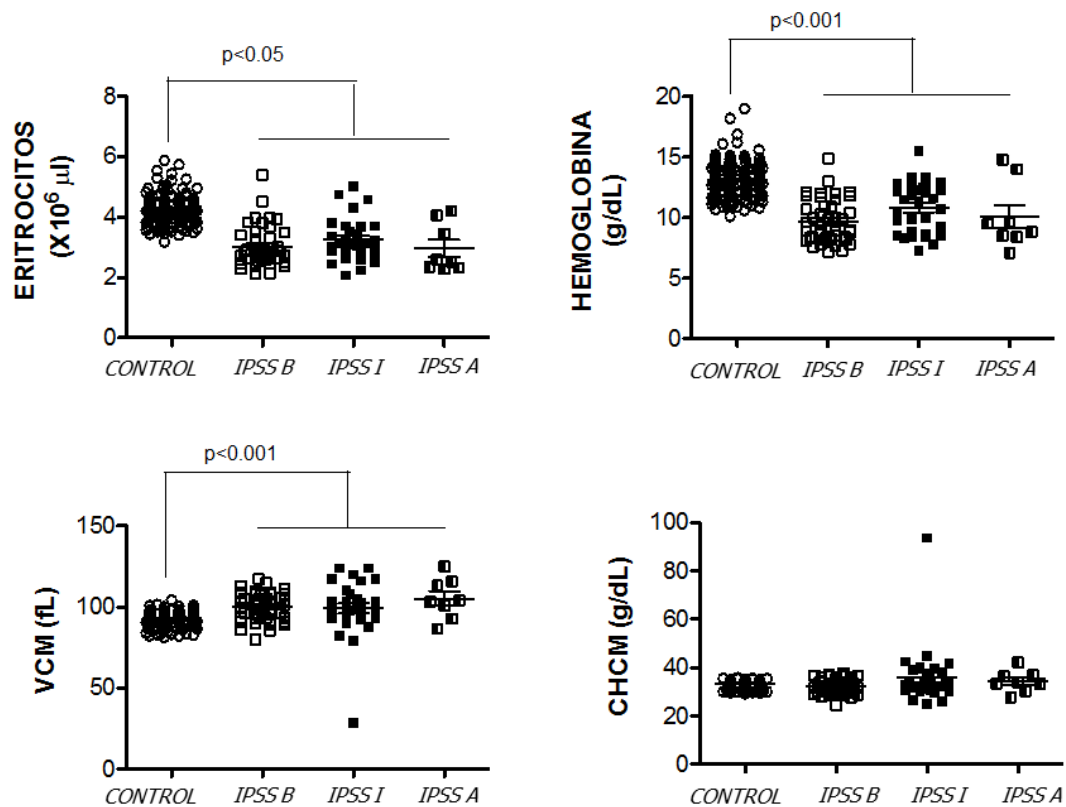


Figura 18. Recuento de eritrocitos, contenido de hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. IPSS B: riesgo IPSS bajo; IPSS I: riesgo IPSS intermedio; IPSS A: riesgo IPSS alto.

La figura 19 muestra en los pacientes con SMD con riesgo IPSS intermedio y alto (IPSS I e IPSS A) una tendencia al aumento en el porcentaje de linfocitos (sin que llegue a ser significativo) y una disminución en el porcentaje de granulocitos (GR). Estos cambios podrían deberse a un aumento en el recuento de monocitos y una disminución en el de neutrófilos según empeora el IPSS.

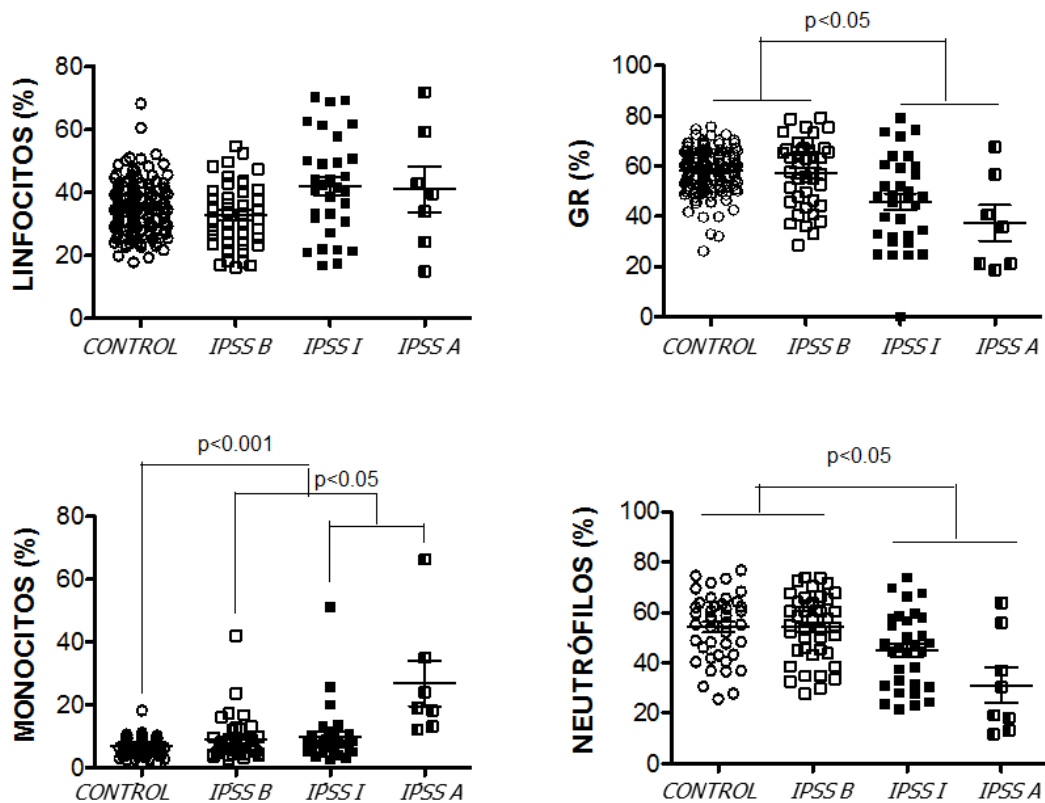


Figura 19. Porcentaje de linfocitos, granulocitos, monocitos y neutrófilos en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el IPSS. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

Si bien en todos los grupos de SMD clasificados según el riesgo IPSS coexisten pacientes con recuento de plaquetas normal, con trombocitopenia o con trombocitosis, la disminución en el número de plaquetas parece ser más marcada en los grupos con peor pronóstico de riesgo IPSS (Figura 20). En ninguno de los grupos existen diferencias en el volumen de las plaquetas respecto del grupo control.

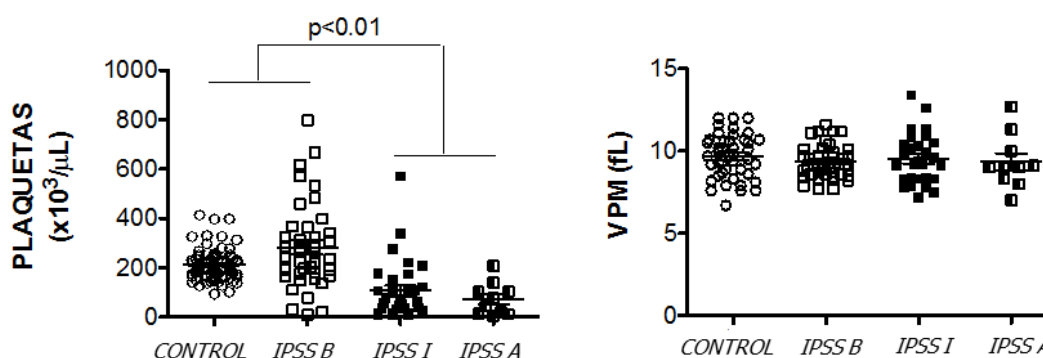


Figura 20. Recuento de plaquetas y VPM en controles sanos y en pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

### 5.3 Relación entre el número de plaquetas y los niveles de trombopoyetina

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del mecanismo de regulación de la formación de plaquetas por TPO se midieron los niveles plasmáticos de esta hormona en controles sanos y en pacientes con SMD. Los controles con un número normal de plaquetas presentaron niveles prácticamente indetectables de TPO, mientras que los pacientes con SMD tenían una concentración circulante de TPO significativamente alta (Figura 21A). Analizamos si existía alguna correlación entre los niveles de TPO y el número de plaquetas y observamos una correlación negativa entre los niveles de TPO y el número de plaquetas en los pacientes con SMD (Figura 21B).

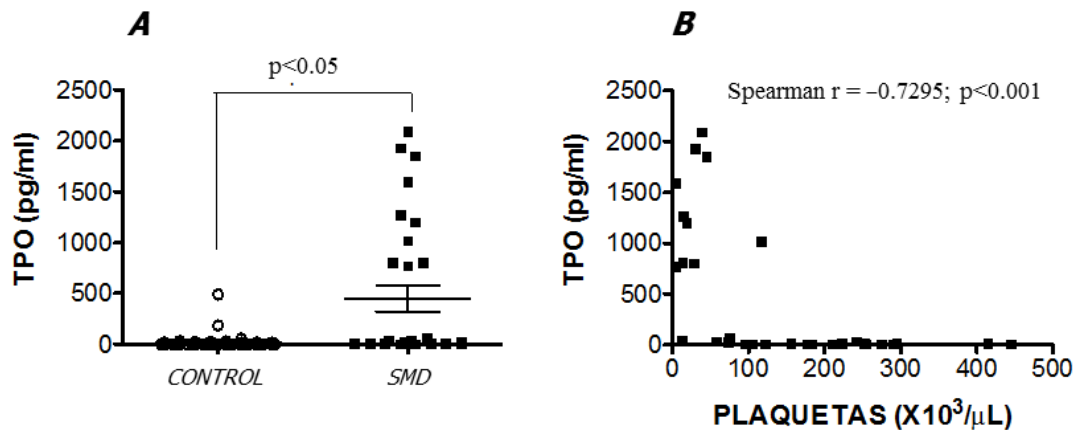


Figura 21. Niveles plasmáticos de TPO y su relación con el número de plaquetas.

A) Niveles plasmáticos de TPO determinados por ELISA. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por test “t” de Student. B) Relación entre los niveles plasmáticos de TPO y el recuento plaquetario. Representación del diagrama de dispersión de puntos correspondientes a los niveles de TPO y al número de plaquetas para cada paciente con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.

#### 5.4 Estudio de la producción de plaquetas inmaduras

Con el objetivo de evaluar la capacidad de producir plaquetas de la médula ósea, determinamos el porcentaje de plaquetas inmaduras o reticuladas en los grupos control y de pacientes con SMD. La figura 22A muestra que no hay diferencias entre ambos grupos y la figura 22B que no existe correlación entre el porcentaje de plaquetas inmaduras y el número de plaquetas en los pacientes con los SMD. Estos resultados confirman el hecho de que la médula ósea de los pacientes con SMD presenta una importante disfunción que le impide generar plaquetas a pesar del alto nivel de TPO que poseen en la circulación.

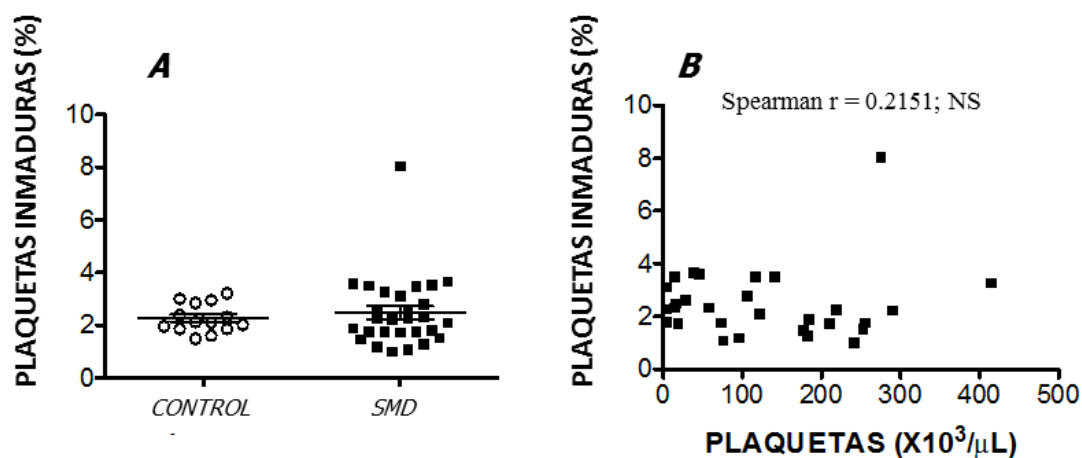


Figura 22. **Plaquetas inmaduras y su relación con el recuento plaquetario.**

A) Porcentaje de plaquetas inmaduras determinado por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por test “t” de Student.

B) Relación entre el porcentaje de plaquetas inmaduras y el recuento plaquetario. Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes al porcentaje de plaquetas inmaduras y al número de plaquetas para cada paciente con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r).

## 5.5 Estudio de la funcionalidad plaquetaria

La capacidad de activación de las plaquetas por agonistas se determinó evaluando la habilidad del receptor de fibrinógeno de unir PAC1, anticuerpo que reconoce la conformación activa del receptor de fibrinógeno y la exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas tras la activación con TRAP.

Las plaquetas de los pacientes con SMD, cualquiera que fuese su recuento, unieron menos PAC1 tras la activación con TRAP, indicando una menor capacidad de activación del receptor de fibrinógeno (Figura 23A). Esta disfunción en la capacidad de activación parece ser más grave cuanto peor es el IPSS (Figura 23B). Resultados similares se obtuvieron al estimular las plaquetas con ADP 20 μM (datos no mostrados).



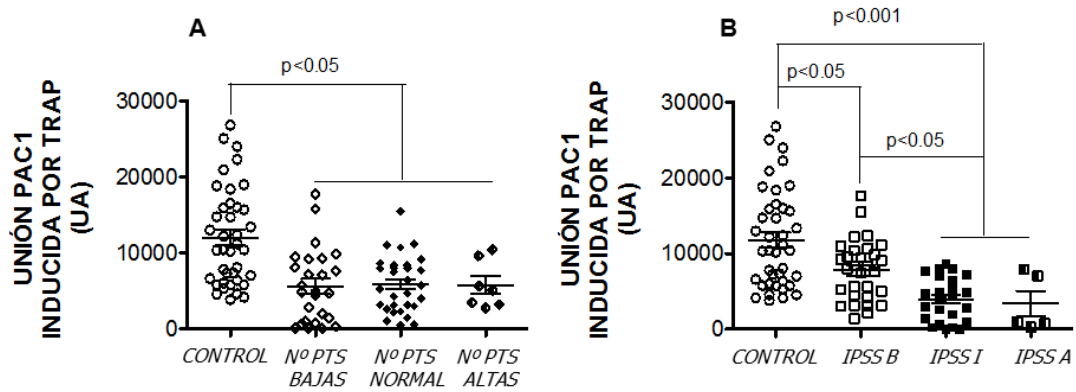


Figura 23. **Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas se estimularon con TRAP 100  $\mu$ M y la unión de PAC1 se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

Estudiamos si existía alguna relación entre el número de plaquetas y la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno y observamos una correlación positiva entre la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno y el número de plaquetas en los pacientes con SMD, lo que indica que cuanto menos plaquetas tienen los pacientes peor es su función (Figura 24).

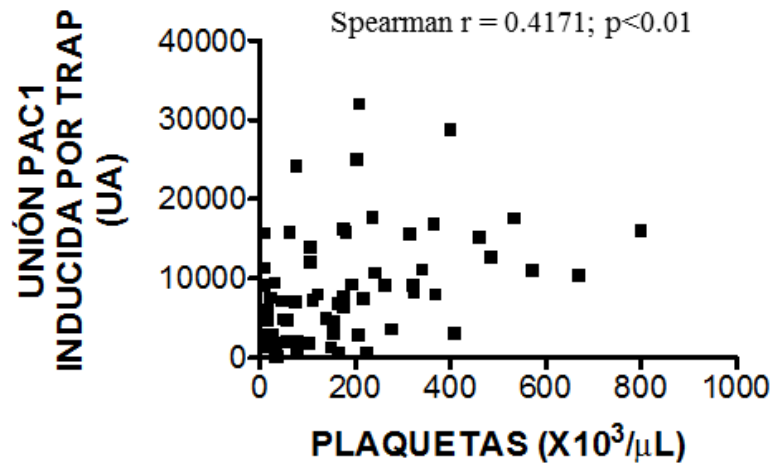


Figura 24. **Relación entre el recuento y la función plaquetaria.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de PAC1 y el número de plaquetas para cada paciente con SMD. Se incluye el valor del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.

Una de las causas que podrían explicar la menor unión de PAC1 es que las plaquetas de los pacientes con SMD presentaran menos receptores para el fibrinógeno. Por este motivo evaluamos la presencia de las subunidades alfaIIb y beta3 que forman el receptor de fibrinógeno y observamos que la expresión de ambas subunidades en las plaquetas de los grupos de los pacientes con SMD no difería de la de las plaquetas del grupo control (Figuras 25 y 26).

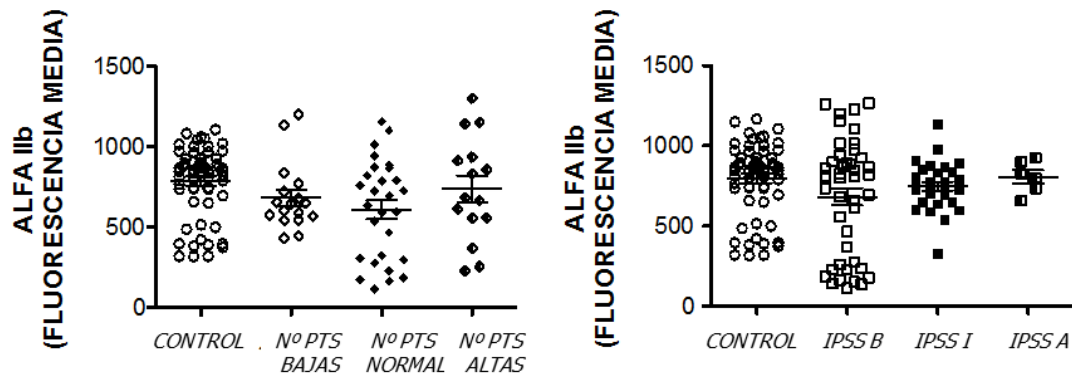


Figura 25. **Expresión de la subunidad  $\alpha$ IIb del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.** Los pacientes con SMD se clasificaron según el recuento de plaquetas y según el índice pronóstico IPSS. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con un anticuerpo específico contra la subunidad  $\alpha$ IIb y la unión del anticuerpo se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

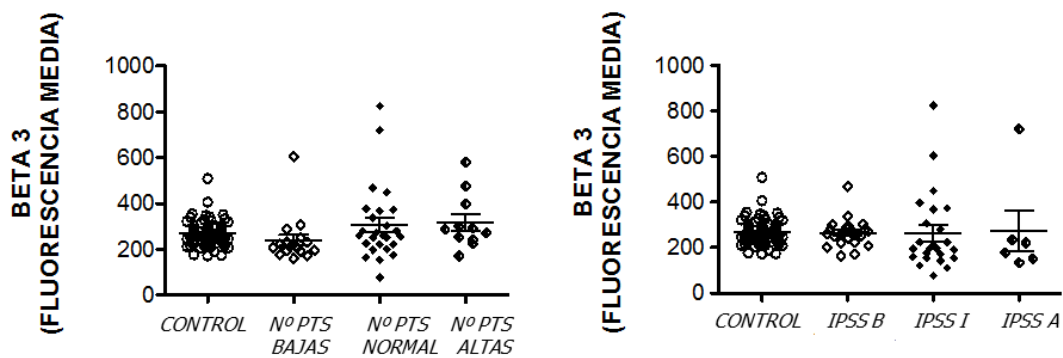


Figura 26. **Expresión de la subunidad  $\beta$ 3 del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.** Los pacientes con SMD se clasificaron según el recuento de plaquetas y según el índice pronóstico IPSS. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con un anticuerpo específico contra la subunidad  $\beta$ 3 y la unión del anticuerpo se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

También evaluamos la exposición de P-selectina (marcador de activación plaquetaria y de liberación de gránulos intraplaquetarios) tras la estimulación con TRAP. De forma similar a lo observado con la capacidad del receptor de fibrinógeno de ser activado, las plaquetas de todos los grupos de pacientes con SMD, clasificados según su recuento plaquetario o según el índice pronóstico IPSS, exponían menos P-selectina en su superficie tras la activación con TRAP (Figura 27A y B).

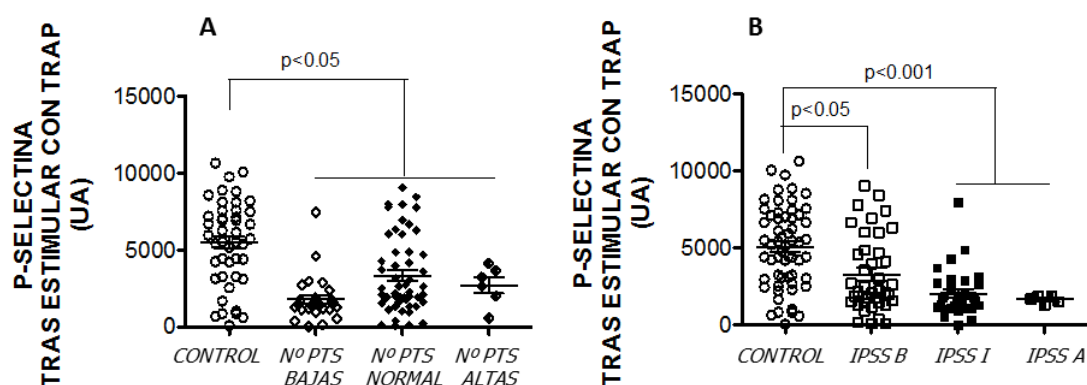


Figura 27. **Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas se estimularon con TRAP 100  $\mu$ M y la unión de un anticuerpo específico contra P-selectina se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

Con el objetivo de confirmar estos resultados determinamos con el equipo PFA-100® el tiempo de obturación de muestras de sangre de controles y de pacientes con SMD con un recuento normal de plaquetas. Las muestras de los pacientes con SMD tenían un tiempo de obturación más prolongado que el de los controles sanos (Figura 28).

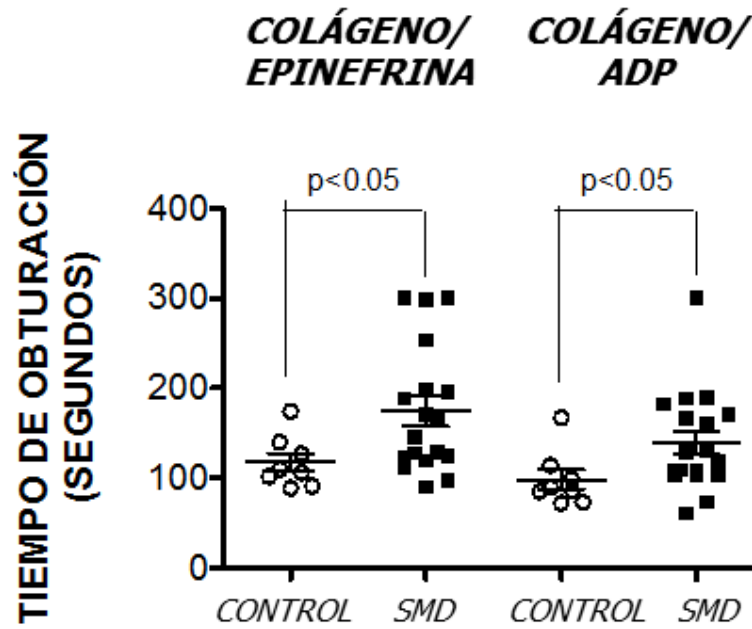


Figura 28. **Función plaquetaria determinada con PFA-100®.** Se determinó el tiempo de obturación de sangre en cartuchos de colágeno/epinefrina y de colágeno/ADP, en controles sanos y en pacientes con SMD y recuento plaquetario normal. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por test “t” de Student.

## 5.6 Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas

### 5.6.1 Exposición de fosfatidilserina

Las plaquetas pueden sufrir apoptosis y una de sus manifestaciones es la exposición de PS en su superficie. Como los pacientes con SMD presentaban una función plaquetaria anómala decidimos estudiar si sus plaquetas presentaban más signos de apoptosis que las de los controles sanos, motivo por el cual determinamos la exposición de PS en condiciones basales. Las plaquetas de los pacientes con SMD, cualquiera que fuese su recuento, exponían más PS en su superficie que las plaquetas de los controles (Figura 29A) y esta exposición era mayor cuanto peor era el pronóstico de los pacientes según el IPSS (Figura 29B).

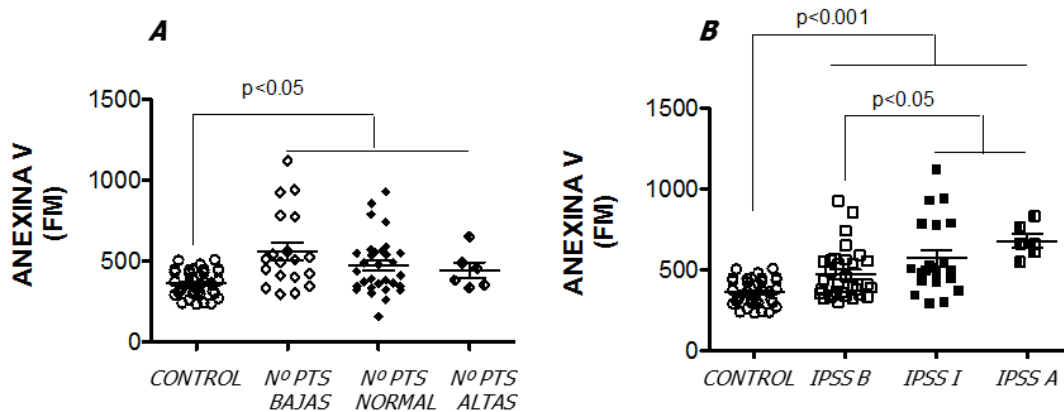


Figura 29. **Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos se mantuvieron en condiciones basales, se incubaron con anexina V marcada con fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

El análisis de la relación entre el número de plaquetas y su grado de apoptosis mostró que cuanto menor era el número de plaquetas que tenían los pacientes con SMD más PS exponían en su superficie (Figura 30).

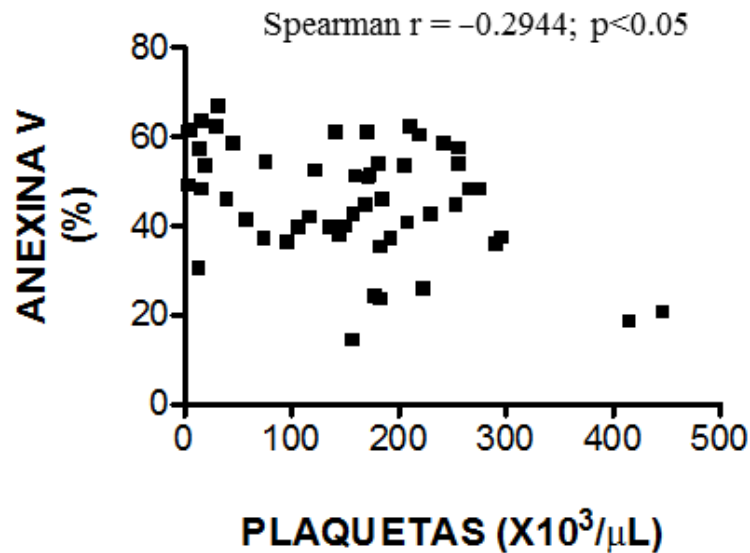


Figura 30. **Relación entre la unión de anexina V a la superficie plaquetaria y el recuento plaquetario.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de anexina V y el número de plaquetas para pacientes con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.

La disfunción en la capacidad de activación de las plaquetas de los pacientes con SMD podía relacionarse con el grado de apoptosis de las mismas, ya que existe una correlación negativa entre la activación inducida por TRAP y la exposición de PS en las plaquetas de los pacientes con SMD (Figura 31).

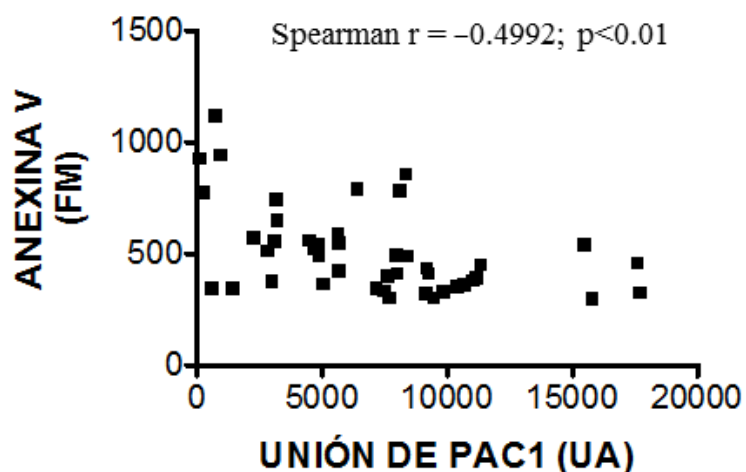


Figura 31. **Relación entre la activación del receptor de fibrinógeno y la exposición de fosfatidilserina.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de PAC1 y de anexina V para cada paciente con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.



### 5.6.2 Expresión de proteínas pro y antiapoptosis

La expresión de la proteína proapoptosis BAX está aumentada en todas las plaquetas de los pacientes con SMD. La expresión de BAX es mayor cuanto menor es el número de plaquetas (Figura 32A) y cuanto peor es el índice pronóstico IPSS (Figura 32B).

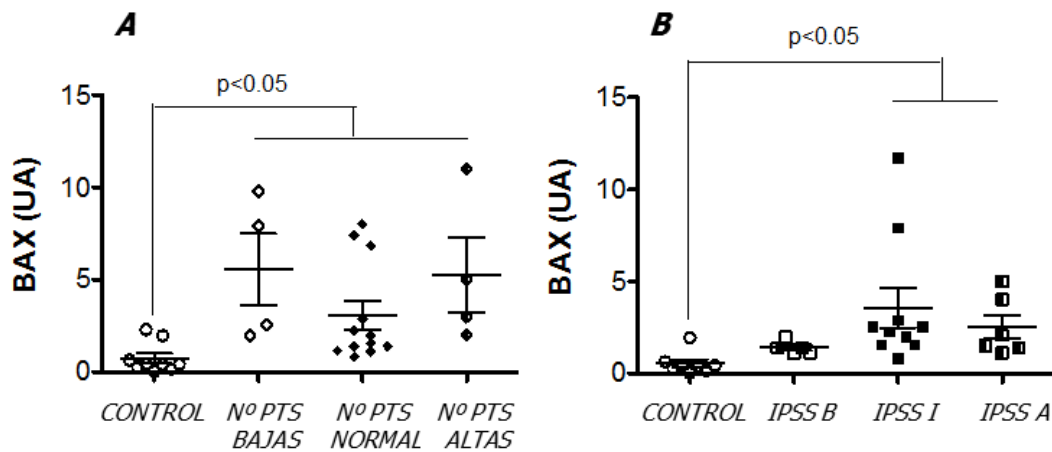


Figura 32. **Expresión de proteínas proapoptosis: BAX.** Lisados de plaquetas (30  $\mu$ g) se corren en un gel de SDS-PAGE y se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de BAX se testa con un anticuerpo específico. La expresión de BAX se evalúa por densitometría y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

La expresión de BAX se correlaciona de forma inversa con el recuento de plaquetas (Figura 33A) y de forma directa con el nivel de exposición de PS (Figura 33B).

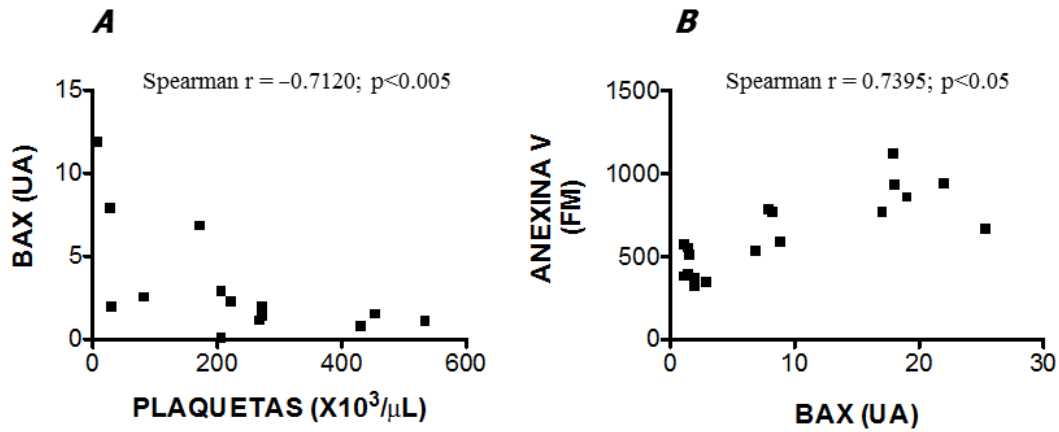


Figura 33. **Relación entre la expresión de BAX y el número de plaquetas y la exposición de fosfatidilserina.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la expresión de BAX y el recuento de plaquetas (A) y a la expresión de BAX y la unión de anexina V (B) para cada paciente con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.

La expresión de la proteína proapoptosis BAK (Figura 34) y de las proteínas antiapoptosis BCL-2 (Figura 35) y BCL-X<sub>L</sub> (Figura 36) en los pacientes con SMD es similar a la del grupo control sano. No existe correlación entre la expresión de estas proteínas y el recuento de plaquetas (Figura 37).

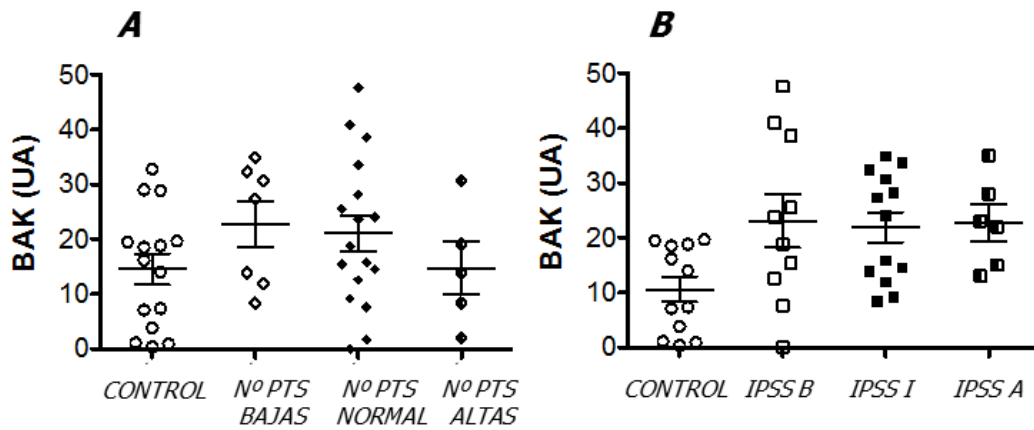


Figura 34. **Expresión de proteínas proapoptosis: BAK.** Lisados de plaquetas (30  $\mu$ g) se corren en un gel de SDS-PAGE y se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de BAK se testa con un anticuerpo específico. La expresión de BAK se evalúa por densitometría y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. No existen diferencias significativas entre los grupos. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

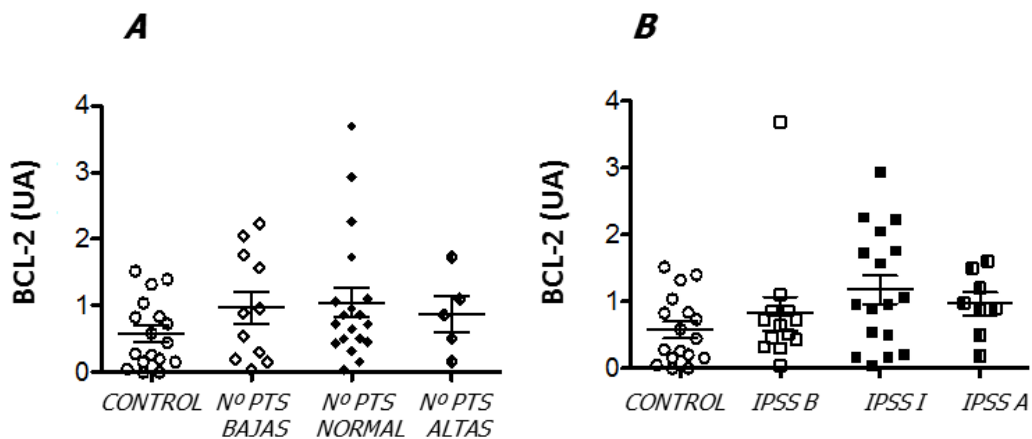


Figura 35. **Expresión de proteínas antiapoptosis: BCL-2.** Lisados de plaquetas (30  $\mu$ g) se corren en un gel de SDS-PAGE y se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de BCL-2 se testa con un anticuerpo específico. La expresión de BCL-2 se evalúa por densitometría y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. No existen diferencias significativas entre los grupos. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

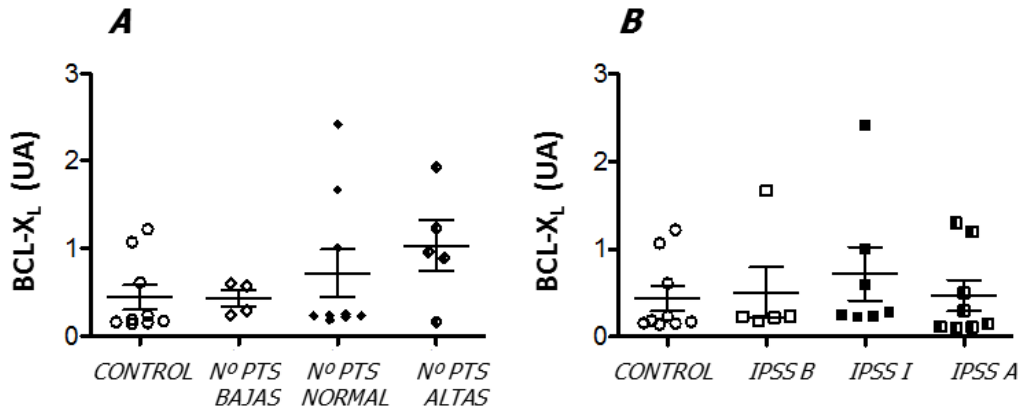


Figura 36. **Expresión de proteínas antiapoptosis: BCL-X<sub>L</sub>**. Lisados de plaquetas (30 µg) se corren en un gel de SDS-PAGE y se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de BCL-X<sub>L</sub> se testa con un anticuerpo específico. La expresión de BCL-X<sub>L</sub> se evalúa por densitometría y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn. No existen diferencias significativas entre los grupos. A) Pacientes con SMD clasificados según su recuento plaquetario. B) Pacientes con SMD clasificados según el índice pronóstico IPSS.

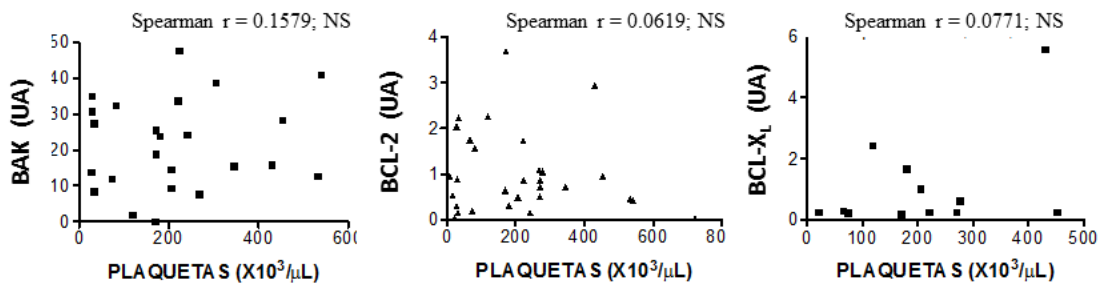


Figura 37. **Relación entre la expresión de BAK, BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> y el número de plaquetas**. Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la expresión de las proteínas pro y antiapoptosis y el recuento de plaquetas para cada paciente con SMD. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p”.

Determinamos la actividad de caspasas por citometría de flujo en plaquetas de un grupo de pacientes con SMD y recuento normal de las mismas y en un grupo control sano. Las plaquetas de los pacientes con SMD tienen las caspasas más activadas que las plaquetas de los controles (Figura 38).

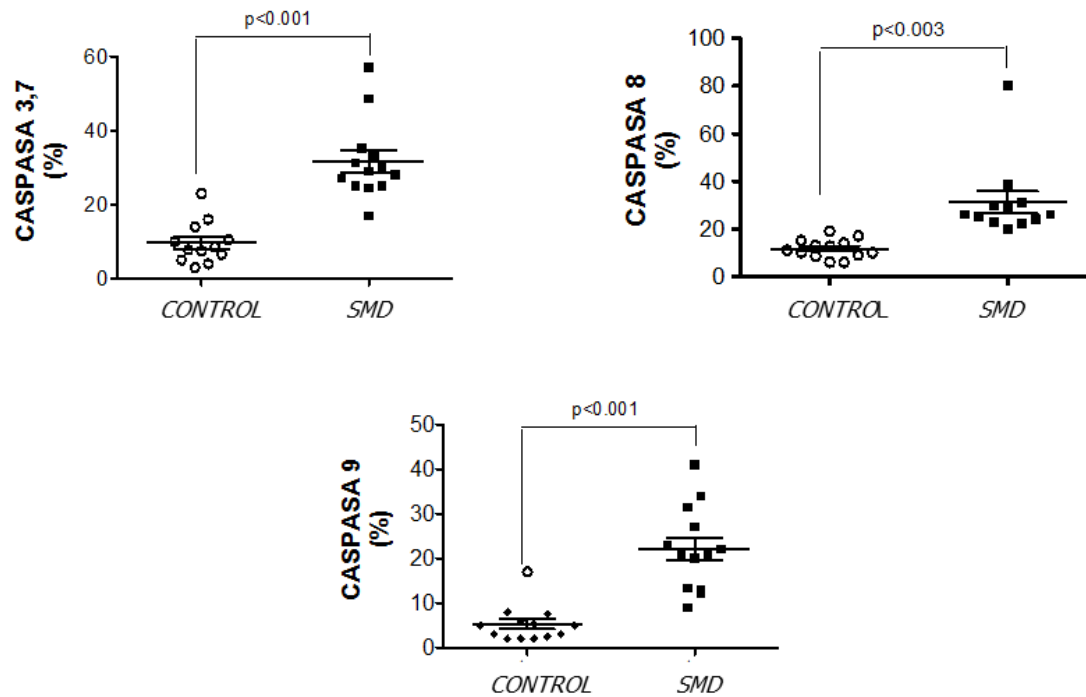


Figura 38. **Actividad de caspasas en las plaquetas.** La actividad de las caspasas se evalúa por citometría de flujo según se describe en métodos. La diferencia entre grupos se analizó con el test de Mann-Whitney.

## 5.7 Estudio de la capacidad procoagulante asociada a micropartículas

Uno de los objetivos de este trabajo es el estudio de la capacidad procoagulante en los pacientes con SMD. Las MPs circulantes en el plasma participan activamente en este proceso. Por este motivo, estudiamos la capacidad procoagulante asociada a la PS y al FT de las MPs y observamos que ambas son mayores en los pacientes con SMD que en el grupo control (Figuras 39A y 39B).

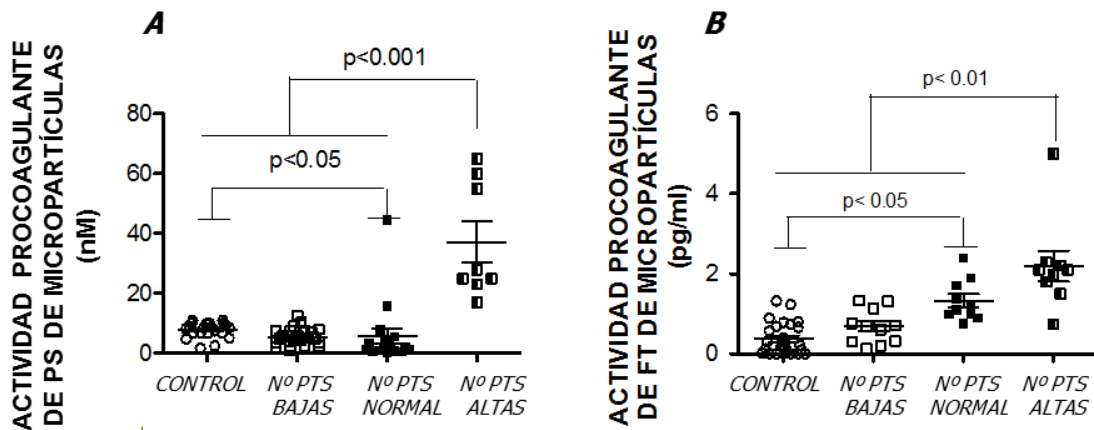


Figura 39. **Actividad procoagulante asociada a micropartículas.** El PFP preparado según se describe en métodos, se ensaya con el kit de Zymuphen que evalúa la actividad procoagulante asociada a la fosfatidilserina (A) o al factor tisular (B) de las MPs. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

## 5.8 Caracterización del origen celular de las micropartículas

Caracterizamos el origen celular de las MPs presentes en los pacientes con SMD y observamos un aumento de las MPs provenientes de los monocitos (Figura 40).

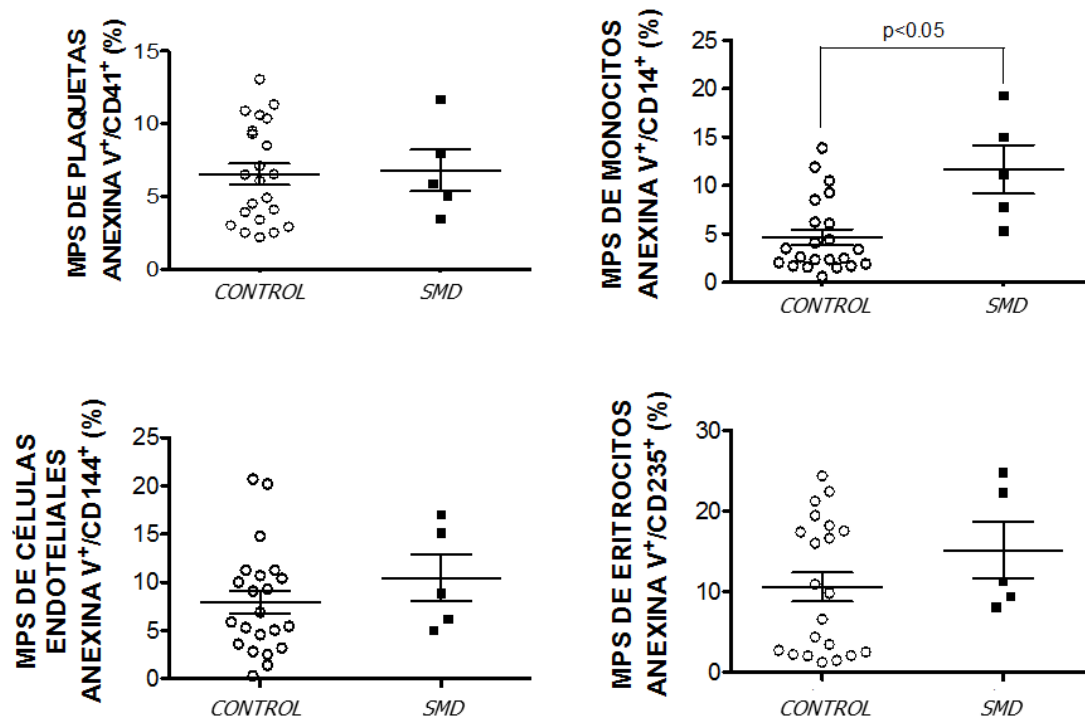


Figura 40. **Detección del origen celular de las micropartículas.** Alícuotas del PFP se incubaron de forma conjunta con anexina V marcada con fluoresceína y un anticuerpo específico para cada tipo celular marcado con ficoeritrina y se analizaron por citometría de flujo según se indica en métodos. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

## 5.9 Capacidad procoagulante del plasma

La capacidad procoagulante del plasma de los pacientes con SMD es similar a la de los controles (Figura 41).

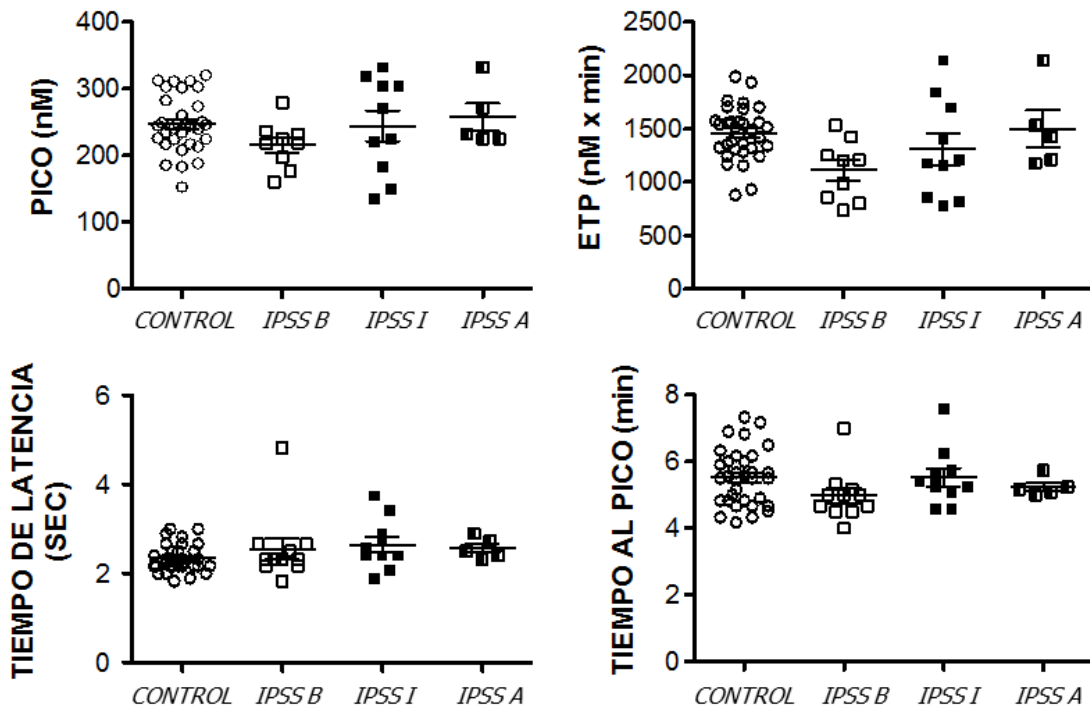


Figura 41. **Test de generación de trombina.** Valores obtenidos en la trombinografía automática calibrada (CAT) en los pacientes con SMD y en controles sanos.



## 5.10 Cinética de formación del coágulo

Estudiamos la cinética de la formación del coágulo por tromboelastometría en PRP ajustado a 25.000 plaquetas por microlitro. Observamos un alargamiento en el CT, en el CFT y en el tiempo al desarrollo de la fuerza máxima del coágulo y una disminución en el ángulo alfa (Figura 42).

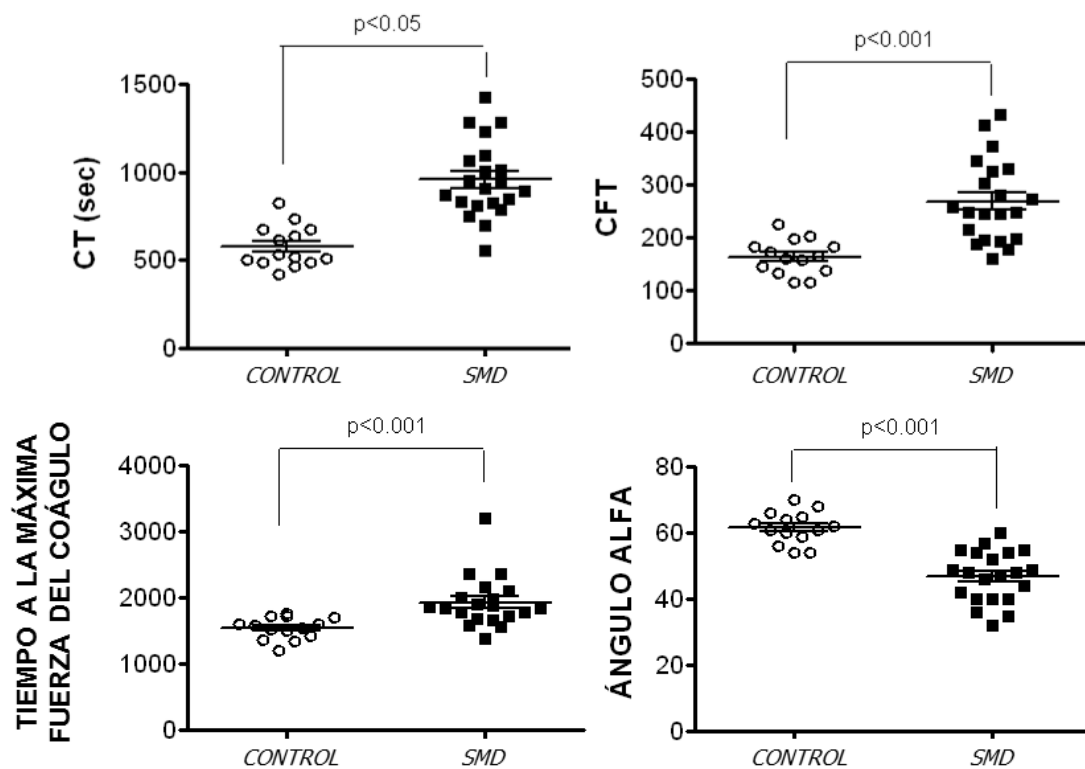


Figura 42. **Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (1).** Evaluamos la cinética de la formación del coágulo en PRP con plaquetas ajustadas a 25.000/microlitro con el ROTEM®. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada con el test de Mann-Witney.

No existen diferencias en la MCF y en la AUC entre el grupo de pacientes con SMD y el grupo control (Figura 43).

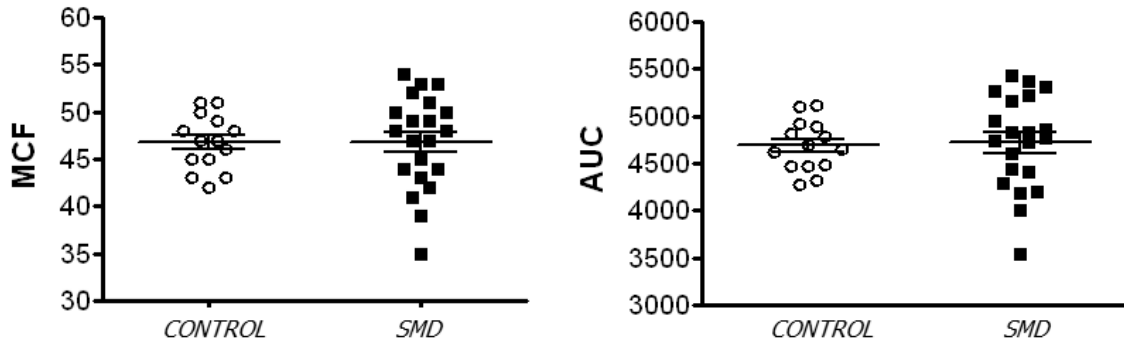


Figura 43. **Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (2).** Evaluamos la cinética de la formación del coágulo en PRP con plaquetas ajustadas a 25.000/microlitro con el ROTEM®. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada con el test de Mann-Witney.

La amplitud del coágulo a los 5 minutos es menor en el grupo de pacientes con SMD, pero a los 10 minutos se iguala con el grupo control (Figura 44A). La lisis del coágulo a los 45 y 60 minutos fue menor en los pacientes con SMD (Figura 44B).

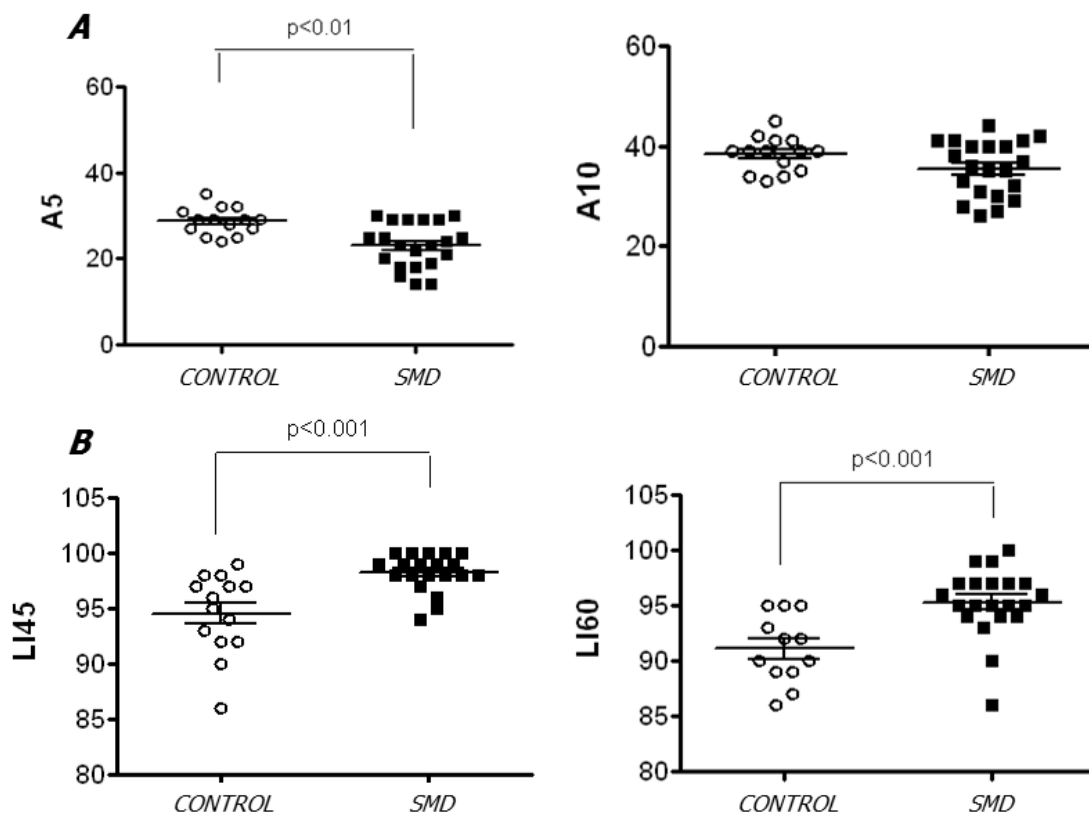


Figura 44. **Tromboelastometría en controles sanos y en pacientes con SMD (3)**. Evaluamos la cinética de la formación del coágulo en PRP con plaquetas ajustadas a 25.000/microlitro con el ROTEM®. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada con el test de Mann-Witney.

La disminución en la fibrinólisis observada en el grupo de pacientes con SMD podría deberse a un aumento en la resistencia a la proteína C (Figura 45).

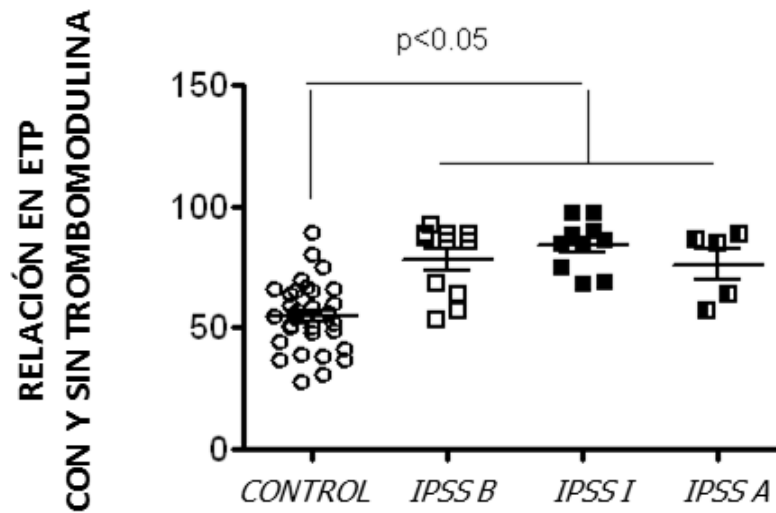


Figura 45. **Resistencia a la proteína C.** Se realiza el CAT en presencia y en ausencia de trombomodulina como se explica en métodos. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

## **6. DISCUSIÓN**



En este trabajo hemos evaluado la hemostasia en los pacientes con SMD y hemos observado que las plaquetas de estos pacientes, independientemente de su número, poseen una disminución en su capacidad de activación que se relaciona con un aumento de la apoptosis.

## 6.1 Recuento de plaquetas y masa plaquetaria según el IPSS

Algunos autores han señalado que, además de la trombocitopenia, otras características de las plaquetas, como por ejemplo la masa, también puede proporcionar información del pronóstico en este grupo de pacientes [144, 145]. Los datos de nuestra cohorte de pacientes parecen apoyar esta teoría ya que los pacientes con un IPSS de alto riesgo presentaron mayor trombocitopenia y el porcentaje más alto de masa plaquetaria baja. Sin embargo, teniendo en cuenta la fórmula para averiguar la masa plaquetaria (volumen plaquetario medio x número de plaquetas) y que no observamos diferencias en el volumen de plaquetas entre los distintos grupos, las diferencias en la masa plaquetaria encontrada en los pacientes con SMD estratificados según el IPSS parecen asociarse con el recuento de plaquetas.

## 6.2. Niveles de TPO y número de plaquetas

La diferenciación de los megacariocitos y la producción de las plaquetas están controladas por la TPO [146, 147]. Nuestros resultados mostraron que los niveles plasmáticos de TPO estaban elevados únicamente en los pacientes con SMD que presentaban trombocitopenia, mientras que en los controles sanos y en los pacientes con SMD y cifra de plaquetas normales, los niveles de TPO fueron casi indetectables. Nuestros resultados difieren de lo comunicado por Tamura y Ogata, quienes observaron concentraciones plasmáticas de TPO elevadas en todos los pacientes con SMD, independientemente de su número de plaquetas [148].

Los niveles de TPO en los pacientes con SMD suelen estar elevados [148-150] pero no son eficientes para estimular la megacariopoyesis. Se ha propuesto que esta respuesta deficiente se debía a una desregulación de las vías de señalización de su receptor c-Mpl o a la acción de citoquinas con efectos sobre la megacariopoyesis opuestos a la TPO.

En estos momentos se están realizando ensayos clínicos para usar agonistas de los receptores de TPO, originalmente desarrollados para el tratamiento de la trombocitopenia inmune, para tratar pacientes con SMD [151]. En este sentido aún queda por resolver algún problema de seguridad, como es la potencial estimulación de clones mieloides neoplásicos por los agonistas de TPO [152].

### **6.3 Plaquetas inmaduras en los pacientes con SMD**

Una vez que las plaquetas son liberadas a la circulación pueden conservar durante un corto periodo de tiempo pequeñas cantidades de ARN. Las plaquetas con estas características se consideran plaquetas inmaduras y su porcentaje se utiliza como un marcador de la velocidad de producción de las mismas. En diferentes trabajos se ha referido que el porcentaje de plaquetas inmaduras aumenta en las enfermedades cardiovasculares, trombocitopenia inmune y en las enfermedades mieloproliferativas [153, 154]. Se ha sugerido que la determinación del porcentaje de plaquetas inmaduras puede ser de utilidad en la evaluación del pronóstico de los pacientes con SMD. Los pacientes con trombocitopenia y un porcentaje de plaquetas inmaduras  $\geq 10\%$  presentaron una evolución clínica más favorable que aquellos con un porcentaje menor de plaquetas inmaduras [155].

En nuestro grupo de pacientes no se encontró un incremento en el número de plaquetas inmaduras, cualquiera que fuera el recuento plaquetario, indicando un fallo funcional en la médula ósea. Este dato junto con el hallazgo de niveles altos de TPO, ponen de manifiesto un patrón de trombocitopenia hipoplásico en nuestra cohorte de pacientes con SMD [156].

### **6.4 Características funcionales de las plaquetas**

La capacidad de activación de las plaquetas podría ayudar a clasificar el riesgo hemorrágico en estos pacientes. Estudios previos han demostrado una disminución en la agregación plaquetaria de los pacientes con SMD [157, 158].

Nuestros resultados mostraron una disminución en la activación plaquetaria inducida por agonistas y evaluada a través de la activación del receptor de fibrinógeno y la expresión en la superficie de P-selectina. La alteración en la función plaquetaria se



observó en las plaquetas de los pacientes con SMD, incluso en aquellos que presentaban un recuento normal de las mismas. Esta disminución en la capacidad de activación fue más grave en los pacientes con menor número de plaquetas y cuanto peor era su IPSS.

La disminución en la capacidad de activación de las plaquetas no se debió a una menor expresión en la superficie de receptores para el fibrinógeno, ya que su evaluación por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las dos subunidades de dicho receptor mostró que su expresión era comparable a la observada en las plaquetas de los controles sanos. Resultados similares fueron descritos por Sandes *et al.* [159] quien tampoco observó cambios significativos en los receptores de fibrinógeno, aunque sí una disminución en la expresión de CD36 (receptor de trombospondina) en las plaquetas de los pacientes con SMD. Sin embargo, la disminución en la expresión de CD36 no es responsable de la alteración en la activación plaquetaria ya que se ha demostrado que la deficiencia de CD36 no impide que las plaquetas se activen por los agonistas [160].

La alteración de la función plaquetaria también se determinó midiendo el tiempo de obturación con el equipo PFA-100®.

A igual de otras condiciones, el tiempo de obturación determinado con cartuchos de colágeno/epinefrina es similar para muestras con un número de plaquetas  $>75 \times 10^3 / \mu\text{L}$ . Cuando el recuento plaquetario es menor, el tiempo de obturación se prolonga de forma inversa al número de plaquetas [161]. Por este motivo realizamos estas determinaciones en muestras de pacientes con un número de plaquetas normal y observamos que los pacientes con SMD presentaban un tiempo de obturación más prolongado que el de los controles sanos.

## 6.5 Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas

Las plaquetas pueden sufrir apoptosis desencadenada por eventos extrínsecos o intrínsecos [162]. Durante la apoptosis a través de la vía intrínseca, la pérdida funcional de la proteína antiapoptótica BCL-X<sub>L</sub> libera las proteínas proapoptóticas BAX / BAK que, a su vez, activan a las caspasas [163]. Las caspasas son cisteinil-aspartato proteasas responsables de la expresión en la superficie plaquetaria de signos de apoptosis como la exposición externa de PS [164].

Nuestros resultados mostraron que las plaquetas de los pacientes con SMD expresaban significativamente mayor cantidad de PS en la superficie que los controles sanos. Igualmente se observó que los niveles de las caspasas activadas 3/7, 8 y 9 estaban aumentados en este grupo de pacientes. La exposición de PS se asociaba con un aumento en los niveles de BAX y además esta exposición era mayor cuanto peor era el pronóstico de los pacientes según el IPSS. Por otro lado, se observó que cuanto menor era el recuento plaquetario mayor era la expresión de PS y de BAX en las plaquetas de los pacientes con SMD. Esta observación confirma los datos publicados hasta la actualidad que sugieren que la eliminación genética de BAK y BAX alarga la vida media plaquetaria y que ABT-737 y ABT-263, dos inhibidores de BCL-X<sub>L</sub>, producen una disminución importante en el recuento plaquetario [165-167].

Trabajos previos han comunicado que la exposición de PS en la superficie de las plaquetas también puede ocurrir después de la activación de las mismas por diferentes agonistas [168]. Por este motivo, podríamos pensar que este aumento de PS podía deberse a que estas plaquetas estuvieran más activadas y no a que fueran más apoptóticas. Sin embargo, ya hemos demostrado previamente que las plaquetas de los pacientes con SMD tenían menos capacidad de activación que los controles. Además, nuestros resultados muestran una correlación inversa entre la exposición PS y la activación del receptor de fibrinógeno en las plaquetas, lo que indica una asociación directa entre la apoptosis y el deterioro funcional de las plaquetas de los pacientes con SMD. De acuerdo con estos resultados, se ha observado que la inhibición en ratones de la proteína BCL-X<sub>L</sub>, mediante la administración de ABT-263, causaba la disminución de la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno y una mayor expresión de PS en la superficie de las plaquetas [169].

En nuestro trabajo observamos que la expresión de la proteína pro-apoptosis BAK y de las proteínas anti-apoptosis BCL-2 y BCL-X<sub>L</sub> en los pacientes con SMD es similar a la del grupo control. Tampoco se observó correlación entre la expresión de estas proteínas y el recuento de plaquetas.

## **6.6 Capacidad procoagulante asociada a micropartículas**

A pesar de la trombocitopenia y de la alteración en la funcionalidad plaquetaria, en nuestros pacientes con SMD el número de hemorragias observadas es bajo, y además

estos episodios de sangrado suelen ser leves. Resultados similares han sido descritos ya por Zeidman *et al.* [170]. Este grupo describió alteraciones en la agregación plaquetaria en el 70% de los pacientes con SMD estudiados, pero sólo un 23% de estos pacientes presentaba síntomas hemorrágicos. Del mismo modo, observamos que la mayoría de nuestros pacientes con SMD no presentaron manifestaciones hemorrágicas y que generalmente aquellos con trombocitopenia grave, fueron los que requirieron soporte transfusional.

En consecuencia, creímos de interés investigar si existían otros factores en los pacientes con SMD, que compensarían el riesgo hemorrágico debido a la disminución de la funcionalidad plaquetaria. De esta manera, especulamos sobre la posible participación de las MPs en este evento. La liberación de MPs por acción de diferentes enzimas como la escramblasa, haría que estas MPs ofrecieran una superficie catalítica para diferentes factores de coagulación, facilitando así la formación de trombina y acelerando la formación del trombo [171-173].

La propiedad procoagulante de las MPs se define por los fosfolípidos aniónicos de su superficie y por la presencia de antígenos provenientes de la célula que les dio origen [174].

Observamos que la capacidad procoagulante asociada a MPs era mayor en los pacientes con SMD que en los controles sanos, lo que podría explicar el menor número de episodios hemorrágicos que observamos en nuestros pacientes. Además observamos que esta capacidad procoagulante del plasma asociada a MPs era más alta en los pacientes con mayor número de plaquetas, a más plaquetas más MPs.

Las MPs se liberan por activación o por apoptosis celular. Ya hemos visto que en nuestro grupo de pacientes la activación plaquetaria estaba disminuida, de manera que las MPs deben estar producidas por un aumento de la apoptosis. Evaluamos en nuestro grupo de pacientes la posible existencia de una relación entre la actividad procoagulante asociada a MPs y el grado de apoptosis plaquetaria, medido este último por la expresión de PS en la superficie de las plaquetas y observamos que esta relación sólo existía en el grupo control. Esto podría deberse a que las MPs en los controles fuesen principalmente de origen plaquetario mientras que en los pacientes con SMD de otro o de más de un tipo celular.

Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos, decidimos determinar el origen celular de las MPs en los pacientes estudiados. El aumento de la actividad procoagulante asociada a MPs en los pacientes con SMD derivaba fundamentalmente de los monocitos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos donde observamos un aumento en la capacidad trombogénica asociada al FT de las MPs de los pacientes con SMD.

Las MPs derivadas de los monocitos son muy bajas o indetectables en los individuos sanos, pero están aumentadas en ciertas enfermedades [175].

## **6.7 Técnicas globales para el estudio de la hemostasia**

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se utilizan las técnicas globales de la coagulación para el estudio de la hemostasia en pacientes con SMD: ROTEM® y el CAT.

En el CAT no encontramos diferencias en la capacidad procoagulante del plasma entre los pacientes con SMD y el grupo control.

En el ROTEM® observamos en los pacientes con SMD un alargamiento en el CT, en el CFT y en el tiempo al desarrollo de la fuerza máxima del coágulo y una disminución en el ángulo alfa. Estos parámetros son dependientes del número de plaquetas, pero dado que los experimentos se realizaron en PRP ajustado a un mismo número de plaquetas en pacientes y controles, esta no pudo ser la causa del perfil hipocoagulable de los pacientes con SMD. Nuestros resultados sugieren que la alteración en la funcionalidad plaquetaria puede ser la responsable del perfil procoagulante disminuido en estos pacientes. No se encontraron diferencias entre la MCF y en la AUC entre el grupo de pacientes con SMD y el grupo control. La lisis del coágulo fue menor en los pacientes con SMD. Esta disminución en la fibrinólisis podría explicarse, por un lado, por el aumento en la resistencia a la proteína C y por otro, por el aumento de las MPs observado en estos pacientes. El aumento de las MPs circulantes induce la formación de un coágulo de fibrina más compacto que lo hace menos susceptible a la fibrinólisis.

Estos resultados en su conjunto resaltan la importancia de determinar la función hemostática y la apoptosis de las plaquetas de los pacientes con SMD a la hora de

evaluar las opciones terapéuticas, ya que la mayoría de los tratamientos utilizados tales como decitabina [176], tipifarnib [177], lenalidomida [178], sirolimus [179] y azacitidina [180] pueden causar trombocitopenia.



## **7. CONCLUSIONES**





1. En los pacientes con SMD los niveles de TPO suelen estar elevados, sin embargo este hecho no es suficiente para estimular la megacariopoyesis, lo que sugiere que debe haber una alteración en la vía de señalización intracelular inducida por la activación de los receptores Mpl o en otros mecanismos involucrados en la producción de las plaquetas.
2. El número de plaquetas inmaduras no está aumentado en los pacientes con SMD, lo que indica un fallo funcional en la médula ósea de estos pacientes.
3. Las plaquetas de los pacientes con SMD tienen una menor capacidad de ser activadas por agonistas, lo que parece deberse a un aumento en su apoptosis. Esta disminución en la capacidad de activación es más grave en los pacientes con menor número de plaquetas y cuanto peor es su IPSS.
4. Los pacientes con SMD presentan un aumento en la capacidad procoagulante asociada a MPs procedentes de los monocitos. Este hecho podría explicar el menor número de episodios hemorrágicos que observamos en estos pacientes.
5. La tromboelastometría rotacional (ROTEM®) demuestra que la alteración en la funcionalidad plaquetaria puede ser la responsable del perfil procoagulante disminuido en estos pacientes. Además, los pacientes con SMD presentan una disminución en la fibrinólisis que podría explicarse por el aumento en la resistencia a la proteína C y por el aumento de las MPs observado en estos pacientes.
6. Estos resultados sugieren que sería importante conocer la función hemostática y la apoptosis de las plaquetas de los pacientes con SMD a la hora de evaluar las opciones terapéuticas para estos pacientes ya que la mayoría de los tratamientos utilizados pueden causar trombocitopenia.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Catenacci, D.V. and G.J. Schiller, *Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review*. Blood Rev, 2005. **19**(6): p. 301-19.
2. Troy, J.D., et al., *Myelodysplastic syndromes in the United States: an update for clinicians*. Ann Med, 2014. **46**(5): p. 283-9.
3. Strom, S.S., et al., *Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 1912-8.
4. Bowen, D.T., *Occupational and environmental etiology of MDS*. Best Pract Res Clin Haematol, 2013. **26**(4): p. 319-26.
5. Corey, S.J., et al., *Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 118-29.
6. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
7. Bouscary, D., et al., *Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 1997. **11**(6): p. 839-45.
8. Gattermann, N., *From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2000. **24**(2): p. 141-51.
9. Parker, J.E., et al., *The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3932-8.
10. Le Pogam, C., et al., *Localization of the NRAS:BCL-2 complex determines anti-apoptotic features associated with progressive disease in myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2013. **37**(3): p. 312-9.
11. Della Porta, M.G., et al., *Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2008. **22**(3): p. 530-7.
12. Monreal, M.B., et al., *Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia*. Cytometry B Clin Cytom, 2006. **70**(2): p. 63-70.
13. Lopez-Holgado, N., et al., *Analysis of hematopoietic progenitor cells in patients with myelodysplastic syndromes according to their cytogenetic abnormalities*. Leuk Res, 2004. **28**(11): p. 1181-7.
14. Greenberg, P.L., N.S. Young, and N. Gattermann, *Myelodysplastic syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 136-61.

15. Delforge, M., et al., *CD34+ marrow progenitors from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have reduced expression of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins*. *Leukemia*, 2005. **19**(1): p. 57-63.
16. Chamuleau, M.E., et al., *Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome*. *Haematologica*, 2009. **94**(4): p. 496-506.
17. Saif, M.W., J.L. Hopkins, and S.D. Gore, *Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(11): p. 2083-92.
18. Fenaux, P., *Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment*. *Semin Hematol*, 2004. **41**(2 Suppl 4): p. 6-12.
19. Fozza, C., et al., *Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(8): p. 947-55.
20. Komrokji, R.S., et al., *A phase II multicenter rabbit anti-thymocyte globulin trial in patients with myelodysplastic syndromes identifying a novel model for response prediction*. *Haematologica*, 2014. **99**(7): p. 1176-83.
21. Parikh, A.R., M.J. Olnes, and A.J. Barrett, *Immunomodulatory treatment of myelodysplastic syndromes: antithymocyte globulin, cyclosporine, and alemtuzumab*. *Semin Hematol*, 2012. **49**(4): p. 304-11.
22. Kochenderfer, J.N., et al., *Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3639-45.
23. Steidl, C., et al., *Adequate cytogenetic examination in myelodysplastic syndromes: analysis of 529 patients*. *Leuk Res*, 2005. **29**(9): p. 987-93.
24. Sole, F., et al., *Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes*. *Haematologica*, 2005. **90**(9): p. 1168-78.
25. Mallo, M., et al., *Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q*. *Haematologica*, 2008. **93**(7): p. 1001-8.
26. Boulwood, J., et al., *Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome*. *Blood*, 2002. **99**(12): p. 4638-41.

27. Thomay, K., et al., *Chromosomal instability and telomere shortening in long-term culture of hematopoietic stem cells: insights from a cell culture model of RPS14 haploinsufficiency*. Cytogenet Genome Res, 2014. **142**(1): p. 14-20.
28. Adema, V., et al., *Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: does -7/7q- detection by FISH have prognostic value?* Leuk Res, 2013. **37**(4): p. 416-21.
29. Gupta, R., et al., *Myelodysplastic syndrome with isolated deletion of chromosome 20q: an indolent disease with minimal morphological dysplasia and frequent thrombocytopenic presentation*. Br J Haematol, 2007. **139**(2): p. 265-8.
30. Steensma, D.P., *The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: in the shadow of acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2007. **92**(6): p. 723-7.
31. Haferlach, T., et al., *Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(2): p. 90-7.
32. Christiansen, D.H., M.K. Andersen, and J. Pedersen-Bjergaard, *Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1474-81.
33. Chan, E.M., et al., *AML1-FOG2 fusion protein in myelodysplasia*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4523-6.
34. Kolquist, K.A., et al., *Microarray-based comparative genomic hybridization of cancer targets reveals novel, recurrent genetic aberrations in the myelodysplastic syndromes*. Cancer Genet, 2011. **204**(11): p. 603-28.
35. Nishino, H.T. and C.C. Chang, *Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis*. Arch Pathol Lab Med, 2005. **129**(10): p. 1299-310.
36. Issa, J.P., *The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease*. Blood, 2013. **121**(19): p. 3811-7.
37. Jiang, Y., et al., *Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1315-25.
38. Aggerholm, A., et al., *Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients*. Eur J Haematol, 2006. **76**(1): p. 23-32.

39. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 805-15.
40. Deeg, H.J., *Marrow stroma in MDS: culprit or bystander?* Leuk Res, 2002. **26**(7): p. 687-8.
41. Verma, A. and A.F. List, *Cytokine targets in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Curr Hematol Rep, 2005. **4**(6): p. 429-35.
42. Santamaria, C., et al., *Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients*. Haematologica, 2012. **97**(8): p. 1218-24.
43. Ramakrishnan, A., et al., *The stromal component of the marrow microenvironment is not derived from the malignant clone in MDS*. Blood, 2006. **108**(2): p. 772-3.
44. Alvi, S., et al., *Successful establishment of long-term bone marrow cultures in 103 patients with myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2001. **25**(11): p. 941-54.
45. Borojevic, R., et al., *Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression*. Leuk Res, 2004. **28**(8): p. 831-44.
46. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
47. Aguayo, A., et al., *Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2240-5.
48. Lundberg, L.G., et al., *Angiogenesis in relation to clinical stage, apoptosis and prognostic score in myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2006. **30**(3): p. 247-53.
49. Keith, T., et al., *Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia*. Br J Haematol, 2007. **137**(3): p. 206-15.
50. Bulycheva, E., et al., *Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies*. Leukemia, 2015. **29**(2): p. 259-68.
51. Mufti, G.J., et al., *Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts*. Haematologica, 2008. **93**(11): p. 1712-7.



52. Tefferi, A. and J.W. Vardiman, *Myelodysplastic syndromes*. N Engl J Med, 2009. **361**(19): p. 1872-85.
53. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
54. Valent, P., et al., *Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference*. Leuk Res, 2007. **31**(6): p. 727-36.
55. Bernasconi, P., et al., *World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 2007. **137**(3): p. 193-205.
56. Fenaux, P., *Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes*. Int J Hematol, 2001. **73**(4): p. 429-37.
57. Panani, A.D. and C. Roussos, *Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: clinical implications*. Cancer Lett, 2006. **235**(2): p. 177-90.
58. Sabattini, E., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview*. Pathologica, 2010. **102**(3): p. 83-7.
59. Wong, A.K., et al., *Loss of the Y chromosome: an age-related or clonal phenomenon in acute myelogenous leukemia/myelodysplastic syndrome?* Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(8): p. 1329-32.
60. Porwit, A., *Is There a Role for Flow Cytometry in the Evaluation of Patients With Myelodysplastic Syndromes?* Curr Hematol Malig Rep, 2015. **10**(3): p. 309-17.
61. Westers, T.M., et al., *Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group*. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1730-41.
62. Bejar, R., et al., *Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2496-506.
63. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.

64. Malcovati, L., et al., *SF3B1* mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*, 2015. **126**(2): p. 233-41.
65. Bejar, R., *Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Haematologica*, 2014. **99**(6): p. 956-64.
66. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 1982. **51**(2): p. 189-99.
67. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
68. Sanz, G.F., M.A. Sanz, and P.L. Greenberg, *Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes*. *Haematologica*, 1998. **83**(4): p. 358-68.
69. Cazzola, M., *Risk assessment in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*. *Haematologica*, 2011. **96**(3): p. 349-52.
70. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
71. Sanz, G.F., et al., *Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients*. *Blood*, 1989. **74**(1): p. 395-408.
72. Morel, P., et al., *Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases*. *Leukemia*, 1993. **7**(9): p. 1315-23.
73. Schanz, J., et al., *Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. 1963-70.
74. Garcia-Manero, G., et al., *A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome*. *Leukemia*, 2008. **22**(3): p. 538-43.
75. Kantarjian, H., et al., *Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System*. *Cancer*, 2008. **113**(6): p. 1351-61.
76. Malcovati, L., et al., *Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(23): p. 3503-10.

77. Tong, W.G., et al., *Predicting survival of patients with hypocellular myelodysplastic syndrome: development of a disease-specific prognostic score system*. *Cancer*, 2012. **118**(18): p. 4462-70.
78. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2454-65.
79. Cordoba, I., et al., *The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome*. *Leuk Res*, 2012. **36**(3): p. 287-92.
80. Breccia, M., et al., *Neutropenia at baseline could indicate poor prognosis in low/intermediate risk myelodysplastic syndrome patients*. *Leuk Res*, 2012. **36**(5): p. 546-7.
81. Malcovati, L., et al., *Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS)*. *Haematologica*, 2011. **96**(10): p. 1433-40.
82. Breccia, M., et al., *The degree of anemia has an impact on survival in myelodysplastic syndrome patients classified with WPSS*. *Haematologica*, 2011. **96**(12): p. e45.
83. Gonzalez-Porras, J.R., et al., *Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome*. *Cancer*, 2011. **117**(24): p. 5529-37.
84. Sole, F., et al., *Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes*. *Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica*. *Br J Haematol*, 2000. **108**(2): p. 346-56.
85. Haase, D., et al., *New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients*. *Blood*, 2007. **110**(13): p. 4385-95.
86. Schanz, J., et al., *New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(8): p. 820-9.
87. Della Porta, M.G., et al., *Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(5): p. 754-62.
88. Buesche, G., et al., *Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2008. **22**(2): p. 313-22.

89. Lee, S.J., et al., *Development and validation of a prognostic index for 4-year mortality in older adults*. JAMA, 2006. **295**(7): p. 801-8.
90. Sorror, M.L., et al., *Comorbidity and disease status based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation*. J Clin Oncol, 2007. **25**(27): p. 4246-54.
91. Della Porta, M.G., et al., *Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome*. Haematologica, 2011. **96**(3): p. 441-9.
92. Germing, U., et al., *Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS)*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2223-31.
93. Wimazal, F., et al., *Prognostic significance of serial determinations of lactate dehydrogenase (LDH) in the follow-up of patients with myelodysplastic syndromes*. Ann Oncol, 2008. **19**(5): p. 970-6.
94. Gatto, S., et al., *Contribution of beta-2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS)*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1622-5.
95. Neumann, F., et al., *Levels of beta 2 microglobulin have a prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome with regard to survival and the risk of transformation into acute myelogenous leukemia*. Leuk Res, 2009. **33**(2): p. 232-6.
96. Kaushansky, K., et al., *Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 568-71.
97. Slayton, W.B., et al., *Developmental differences in megakaryocyte maturation are determined by the microenvironment*. Stem Cells, 2005. **23**(9): p. 1400-8.
98. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
99. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, *The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2720-30.
100. Cohen-Solal, K., et al., *Constitutive expression of Mpl ligand transcripts during thrombocytopenia or thrombocytosis*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2578-84.

101. Fielder, P.J., et al., *Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2154-61.
102. McCarty, J.M., et al., *Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3668-75.
103. Grozovsky, R., et al., *The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling*. Nat Med, 2015. **21**(1): p. 47-54.
104. Grewal, P.K., *The Ashwell-Morell receptor*. Methods Enzymol, 2010. **479**: p. 223-41.
105. Grewal, P.K., et al., *The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis*. Nat Med, 2008. **14**(6): p. 648-55.
106. Monti, E., et al., *Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2010. **64**: p. 403-79.
107. Lowenberg, E.C., J.C. Meijers, and M. Levi, *Platelet-vessel wall interaction in health and disease*. Neth J Med, 2010. **68**(6): p. 242-51.
108. Prieschl, E.E. and T. Baumruker, *Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling*. Immunol Today, 2000. **21**(11): p. 555-60.
109. Pani, B. and B.B. Singh, *Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling*. Cell Calcium, 2009. **45**(6): p. 625-33.
110. Napione, L., et al., *Integrins: a flexible platform for endothelial vascular tyrosine kinase receptors*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(1): p. 18-22.
111. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
112. Lopez-Vilchez, I., et al., *Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): p. 202-11.
113. Jardin, I., et al., *Differential involvement of thrombin receptors in Ca<sup>2+</sup> release from two different intracellular stores in human platelets*. Biochem J, 2007. **401**(1): p. 167-74.
114. McNicol, A. and S.J. Israels, *Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis*. Thromb Res, 1999. **95**(1): p. 1-18.
115. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.

116. Coller, B.S. and S.J. Shattil, *The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend*. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3011-25.
117. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
118. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(3): p. 439-51.
119. Polgar, J., J. Matuskova, and D.D. Wagner, *The P-selectin, tissue factor, coagulation triad*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1590-6.
120. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(9): p. 938-49.
121. Revak, S.D., C.G. Cochrane, and J.H. Griffin, *The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen*. *J Clin Invest*, 1977. **59**(6): p. 1167-75.
122. Pixley, R.A., et al., *A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(21): p. 10140-5.
123. Fair, B.D., et al., *Detection by fluorescence of structural changes accompanying the activation of Hageman factor (factor XII)*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1977. **155**(2): p. 199-202.
124. Vroman, L., *Effects of Hydrophobic Surfaces Upon Blood Coagulation*. *Thromb Diath Haemorrh*, 1964. **10**: p. 455-93.
125. Silverberg, M. and A.P. Kaplan, *Enzymatic activities of activated and zymogen forms of human Hageman factor (factor XII)*. *Blood*, 1982. **60**(1): p. 64-70.
126. Griffin, J.H., *Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(4): p. 1998-2002.
127. Zhuo, R. and E.A. Vogler, *Practical application of a chromogenic FXIIIa assay*. *Biomaterials*, 2006. **27**(28): p. 4840-5.
128. Silverberg, M., et al., *Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(15): p. 7281-6.

129. Rawala-Sheikh, R., et al., *Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa*. *Biochemistry*, 1990. **29**(10): p. 2606-11.
130. Osterud, B., B.N. Bouma, and J.H. Griffin, *Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(17): p. 5946-51.
131. Whelihan, M.F., et al., *Coagulation procofactor activation by factor XIa*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(7): p. 1532-9.
132. Weisel, J.W. and R.I. Litvinov, *Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications*. *Blood*, 2013. **121**(10): p. 1712-9.
133. Muszbek, L., et al., *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 931-72.
134. Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1894-904.
135. Hemker, H.C., et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(5): p. 553-61.
136. Hemker, H.C., et al., *Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(1): p. 4-15.
137. Hemker, H.C., et al., *The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002. **32**(5-6): p. 249-53.
138. Trelinski, J., et al., *Assessment of rotation thromboelastometry (ROTEM) parameters in patients with multiple myeloma at diagnosis*. *Thromb Res*, 2014. **133**(4): p. 667-70.
139. Kile, B.T., *The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets*. *Br J Haematol*, 2014. **165**(2): p. 217-26.
140. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 47-59.
141. Leytin, V., *Apoptosis in the anucleate platelet*. *Blood Rev*, 2012. **26**(2): p. 51-63.
142. Kile, B.T., *The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7 Suppl 1**: p. 214-7.

143. Hayashi, S., et al., [*Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders*]. Rinsho Ketsueki, 1999. **40**(3): p. 205-12.
144. Bowles, K.M., B.A. Warner, and T.P. Baglin, *Platelet mass has prognostic value in patients with myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 2006. **135**(2): p. 198-200.
145. Germing, U., et al., *Platelet morphology, platelet mass, platelet count and prognosis in patients with myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 2007. **138**(3): p. 399-400.
146. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, *The purification of megapoielin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11104-8.
147. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production*. Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 521-5.
148. Tamura, H., et al., *Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 1998. **103**(3): p. 778-84.
149. Martin, M., et al., *Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes*. Thromb Haemost, 2013. **109**(5): p. 909-19.
150. Zwierzina, H., et al., *Endogenous serum thrombopoietin concentrations in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 1998. **12**(1): p. 59-64.
151. Li, W., et al., *Thrombocytopenia in MDS: epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies*. Leukemia, 2015.
152. Brierley, C.K. and D.P. Steensma, *Thrombopoiesis-stimulating agents and myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 2015. **169**(3): p. 309-23.
153. Cesari, F., et al., *Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy*. Thromb Haemost, 2008. **99**(5): p. 930-5.
154. Monteagudo, M., et al., *Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology*. QJM, 2008. **101**(7): p. 549-55.
155. Saigo, K., et al., *Usefulness of immature platelet fraction for the clinical evaluation of myelodysplastic syndromes*. Lab Hematol, 2009. **15**(2): p. 13-6.



156. Kurata, Y., et al., *Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrinogen, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia*. Am J Clin Pathol, 2001. **115**(5): p. 656-64.
157. Girtovitis, F.I., et al., *Defective platelet aggregation in myelodysplastic syndromes*. Acta Haematol, 2007. **118**(2): p. 117-22.
158. Raman, B.K., et al., *Platelet function and structure in myeloproliferative disease, myelodysplastic syndrome, and secondary thrombocytosis*. Am J Clin Pathol, 1989. **91**(6): p. 647-55.
159. Sandes, A.F., et al., *Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes*. Haematologica, 2012. **97**(6): p. 895-902.
160. Podrez, E.A., et al., *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1086-95.
161. Carcao, M.D., et al., *Assessment of thrombocytopenic disorders using the Platelet Function Analyzer (PFA-100)*. Br J Haematol, 2002. **117**(4): p. 961-4.
162. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
163. Kodama, T., et al., *BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13905-13.
164. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
165. Oltersdorf, T., et al., *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 677-81.
166. Wilson, W.H., et al., *Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase I dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity*. Lancet Oncol, 2010. **11**(12): p. 1149-59.
167. Tse, C., et al., *ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3421-8.
168. Schoenwaelder, S.M., et al., *Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function*. Blood, 2009. **114**(3): p. 663-6.

169. Schoenwaelder, S.M., et al., *Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets*. *Blood*, 2011. **118**(6): p. 1663-74.
170. Zeidman, A., et al., *Platelet function and its clinical significance in the myelodysplastic syndromes*. *Hematol J*, 2004. **5**(3): p. 234-8.
171. Sims, P.J. and T. Wiedmer, *Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 266-75.
172. Bevers, E.M., et al., *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1439**(3): p. 317-30.
173. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(2): p. 186-93.
174. Morel, O., et al., *Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(1): p. 15-26.
175. Tesselaar, M.E., et al., *Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?* *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(3): p. 520-7.
176. Kantarjian, H., et al., *Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study*. *Cancer*, 2006. **106**(8): p. 1794-803.
177. Fenaux, P., et al., *A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4158-63.
178. List, A., et al., *Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(6): p. 549-57.
179. Platzbecker, U., et al., *Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome--results of a pilot study*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(5): p. 625-30.
180. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(10): p. 2429-40.

## **9. PUBLICACIONES**



# Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes

Mónica Martín<sup>1\*</sup>; Raquel de Paz<sup>2\*</sup>; Víctor Jiménez-Yuste<sup>1</sup>; Ihosvany Fernández Bello<sup>1</sup>; Elena García Arias Salgado<sup>1</sup>; María Teresa Álvarez<sup>1</sup>; Nora V. Butta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IDIPaz, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Haematology Unit, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

## Summary

Patients with myelodysplastic syndromes (MDS) have a defect in the differentiation of bone marrow multipotent progenitor cells. Thrombocytopenia in MDS patients may be due to premature megakaryocyte death, but platelet apoptotic mechanisms may also occur. This study aimed to study function and apoptotic state of platelets from MDS patients with different platelet count. Reticulated platelets, platelet activation, activated caspases and annexin-V binding were evaluated by flow cytometry. Pro-apoptotic Bax and Bak proteins were determined by western blots and plasma thrombopoietin by ELISA. Microparticle-associated procoagulant activity and thrombin generation capacity of plasma were determined by an activity kit and calibrated automated thrombography, respectively. High plasma thrombopoietin levels and low immature circulating platelet count showed a pattern of hypoplastic thrombocytopenia in MDS patients. Platelets from MDS patients showed reduced activation capacity and more apoptosis signs than controls. Patients with the lowest platelet

count showed less platelet activation and the highest extent of platelet apoptosis. On this basis, patients with thrombocytopenia should suffer more haemorrhagic episodes than is actually observed. Consequently, we tested whether there were some compensatory mechanisms to counteract their expected bleeding tendency. Microparticle-associated procoagulant activity was enhanced in MDS patients with thrombocytopenia, whereas their plasma thrombin generation capacity was similar to control group. This research shows a hypoplastic thrombocytopenia that platelets from MDS patients possess an impaired ability to be stimulated and more apoptosis markers than those from healthy controls, indicating that MDS is a stem cell disorder, and then, both number and function of progeny cells, might be affected.

## Keywords

Platelet pathology, myelodysplastic syndromes, GP IIb/IIIa activation, platelet apoptosis

## Correspondence to:

Nora Butta  
Haematology Unit  
Hospital Universitario La Paz-IDIPaz  
Madrid, Spain  
E-mail: nora.butta@salud.madrid.org

Received: September 14, 2012

Accepted after major revision: January 21, 2013

Prepublished online: February 14, 2013

doi:10.1160/TH12-09-0670

Thromb Haemost 2013; 109: 909–919

\* MM and RdP contributed equally to this work.

## Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of haematopoietic disorders with clonal bone marrow anomalies characterised by ineffective haematopoiesis, morphologic and functional haematopoietic cell abnormalities, and an increased risk of transformation to acute myeloid leukaemia (AML) (1, 2).

Many systems have been developed to classify these syndromes in an attempt to provide a useful tool with clinical and biological relevance to diagnosis, prognosis and treatment of these patients (3, 4). The most-commonly used prognostic classification system for these patients is the International Prognostic Scoring System (IPSS) (5). Growth of the anomalous clone produces impairment in cellular functions and development that can result in one or more peripheral cytopaenias. Even when thrombocytopenia is frequently observed in MDS patients, some of them may present normal or high platelet count. The importance of a low platelet

count is evident since haemorrhage is the cause of death in 60% of patients with low/intermediate-1 IPSS risk and severe thrombocytopenia (6). Maintenance of a normal physiological platelet count results from the equilibrium between its production by megakaryopoiesis and its clearance from circulation. All these mechanisms are tightly controlled by several factors that when unbalanced may cause thrombocytopenia. It has been proposed that thrombocytopenia in MDS patients may be due to premature megakaryocytes death (7), but involvement of platelet apoptotic mechanisms cannot be ruled out (8).

This study aimed to study function and apoptotic state of platelets from MDS patients with different affection in platelet count in order to elucidate whether they reflect anomalies corresponding to a stem cell disorder.

Since our experimental data showed that patients with MDS had an impaired platelet function, our cohort of MDS patients with thrombocytopenia should have suffered more haemorrhagic

episodes than were actually observed. Consequently we also tested whether there were some compensatory mechanisms that could be counteracting the expected bleeding tendency in these patients.

## Design and methods

### Subjects

We recruited 75 patients with MDS, 36% female, mean age 77 years (range: 41 to 93 years), divided into three groups according to IPSS score: 39 with low (L-risk), 27 with intermediate-1 (I-risk) and nine with high risk (H-risk, composed of intermediate-2 plus high risk patients, ► Table 1). Sixty-eight healthy controls, 29% female, mean age 52 years (range: 20 to 76 years) were included in the study. The mean age of the control group was lower than the mean age of patients with MDS because of the difficulty of obtaining samples from older donors. To verify that mean age difference did not bias our results, statistical analyses of data obtained in controls younger or older than 65 years of age were performed and no differences were observed between groups.

Patients with uncontrolled hypertension, hyperlipidaemia, peripheral or coronary artery disease, abnormal hepatic or renal function tests or on treatment with platelet active drugs, lenalidomide, hydroxycarbamide, azacitidina or those who had received a transfusion within 15 days of the study were excluded.

Blood cell counts were performed with a Coulter Ac.T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain). Thrombocytopenia was considered when the platelet count was less than  $100 \times 10^3/\mu\text{l}$  and thrombocytosis when more than  $325 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Platelet mass (mean platelet volume [MPV]  $\times$  platelet count) was classified as low (less than 0.6 ml/l), intermediate (between 0.6-1.2 ml/l) or high (more than 1.2 ml/l).

The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the experimental protocol. The research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration and after receiving patient informed consent.

### Preparation of platelet-rich plasma and washed platelets

Human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (150 g for 20 minutes [min] at 23°C). To obtain washed platelets, the top two-thirds volumes of PRP were collected and centrifuged (650 g for 10 min at 23°C) after the addition of acid-citrate-dextrose (ACD, 1:10). The pellet was resuspended in an equal volume of HEPES buffer (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl and 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.4).

### Determination of platelet activation

PRP was diluted 1:5 with HEPES buffer and incubated with 100  $\mu\text{M}$  thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) or 20  $\mu\text{M}$  adenosine diphosphate (ADP, Sigma, Madrid, Spain) at room temperature (RT). Following incubation, fluores-

cein-isothiocyanate (FITC)-PAC1 (BD Biosciences, Madrid, Spain), a monoclonal antibody (mAb) that recognises activated conformation of fibrinogen receptor or FITC-labelled anti-human P-selectin mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was added for 15 min at RT in the dark. After incubation, platelets were diluted in HEPES buffer for flow cytometry analysis with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and 10,000 events in platelet region were acquired and analysed with BD CellQuest Pro™ software (BD Biosciences).

### Determination of platelet receptors by flow cytometry analysis

PRP was diluted 1:5 in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 20 min at RT in the dark with phycoerythrin (PE)-mAb against the  $\alpha\text{IIb}$  subunit (Biocytex, Marseille, France) or with FITC-mAb against the  $\beta 3$  subunit of the platelet fibrinogen receptor (BD Pharmingen).

### Measurement of phosphatidylserine (PS) exposure on platelet surface

Surface exposure of PS in washed platelets was assessed by measuring the binding of FITC-labelled Annexin V (BD Pharmingen). Briefly, washed platelets were resuspended in Annexin V binding buffer (10 mM HEPES, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) and labelled with FITC-Annexin V. After incubation for 15 min at RT in the dark, samples were analysed by flow cytometry.

To analyse active caspase-3, -8 or -9, PRP was diluted 10-fold with isotonic HEPES-buffered saline with  $\text{Ca}^{2+}$  (150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM Gly-Pro-Arg-Pro (Sigma), 2 mM HEPES, pH 7.4), containing the PE-labelled mAb to  $\alpha 2\text{b}$ , and either FAM-DEVD-FMK, FAM-LETDFMK or FAM-LEHD-FMK (Millipore, Madrid, Spain).

### SDS-PAGE and western blot analysis

Platelet Bak and Bax contents were determined by western blot. Washed cells were lysed with Triton buffer (1% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 300 mM NaCl and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride in PBS) containing a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA free; Roche, Barcelona, Spain). After sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in reduced conditions, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane with a Trans-blot semidry transfer cell (Bio-Rad, Madrid, Spain). Membranes were first blotted with mAb against either Bak (sc-1035) or Bax (sc-23959, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) and then with an antibody against mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (BioRad). Membranes were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL) and densitometric analyses were performed with NIH image software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Anti-actin mAb (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used to confirm that protein inputs in each lane were similar.

**Table 1: Clinical features and therapies of MDS patients.**

		L-RISK	I-RISK	H-RISK
Sex	Male	27 (69.2%)	15 (55.6%)	6 (66.7%)
	Female	12 (30.8%)	12 (44.4%)	3 (33.3%)
Age in years, median (range)		80 (41–93)	75 (53–88)	77 (55–91)
Platelet count (x 10 <sup>3</sup> /μl)		283 ± 176	104 ± 119*	92 ± 112*
Platelet volume (fl)		9.4 ± 1.0	9.5 ± 1.5	9.9 ± 1.9
Platelet mass	High, more than 1.2 ml/l	89.2%	38.5%	30.0%
	Intermediate (0.6–1.2) ml/l	5.4%	30.5%	40.0%
	Low, less than 0.6 ml/l	5.4%	31.0%	40.0%
Transfusional Support	No	25 (64.1%)	10 (37.0%)	1 (11.1%)
	Yes	14 (35.9%)	17 (63.0%)	8 (88.9%)
Platelet transfusional Support	No	37 (94.9%)	15 (55.6%)	3 (33.3%)
	Yes	2 (5.1%)	12 (44.4%)	6 (66.7%)
Treatment	None	17 (43.6%)	19 (70.3%)	4 (44.4%)
	Folic acid	5 (12.8%)	0 (0%)	2 (22.2%)
	Darbepoietin a	4 (10.3%)	0 (0%)	3 (33.3%)
	Deferasidox	5 (12.8%)	2 (7.4%)	0 (0%)
	Erythropoietin	8 (20.5%)	6 (22.2%)	0 (0%)
WHO 2008 classification	RA	0 (0%)	1 (3.7%)	0 (0%)
	RARS	21 (53.8%)	1 (3.7%)	0 (0%)
	RAEB-1	0 (0%)	4 (14.8%)	3 (33.3%)
	RAEB-2	0 (0%)	0 (0%)	3 (33.3%)
	RCMD	6 (15.4%)	13 (48.1%)	2 (22.2%)
	RCUD	8 (20.5%)	2 (7.4%)	0 (0%)
	CMMML	3 (7.7%)	4 (14.8%)	0 (0%)
	5q SD	1 (2.6%)	0 (0%)	1 (11.1%)
Red cell count	Low, less than 3.80 x 10 <sup>6</sup> /μl	35 (89.7%)	20 (74.1%)	8 (88.9%)
	Normal (3.80–5.20) x 10 <sup>6</sup> /μl	4 (10.3%)	7 (25.9%)	1 (11.1%)
	Low, less than 11.5 g/dl	28 (71.8%)	19 (70.4%)	8 (88.9%)
Haemoglobin	Normal 11.5–15.3 g/dl	11 (28.2%)	6 (22.2%)	1 (11.1%)
	High more than 15.3 g/dl	0 (0%)	2 (7.4%)	0 (0%)
Leukocyte count	Low, less than 3.7 x 10 <sup>3</sup> /μl	7 (17.9%)	9 (33.3%)	5 (55.6%)
	Normal (3.7–11.6) x 10 <sup>3</sup> /μl	28 (71.8%)	16 (59.3%)	2 (22.2%)
	High, more than 11.6 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (10.3%)	2 (7.4%)	2 (22.2%)
Cytopenias	None	1 (2.6%)	1 (3.7%)	0 (0%)
	One	37 (94.9%)	7 (25.9%)	1 (11.1%)
	Two	1 (2.6%)	15 (55.6%)	3 (33.3%)
	Three	0 (0%)	4 (14.8%)	5 (55.6%)

### Plasma thrombopoietin (TPO)

EDTA-anticoagulated whole blood was centrifuged at 1,000 g for 15 min at 23°C to obtain platelet-poor plasma (PPP). PPP was centrifuged at 10,000 g for 15 min at RT, and supernatant plasma was

stored at –80°C until the assay. Plasma TPO concentrations were determined by a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

Table 1: continued

		L-RISK	I-RISK	H-RISK
Cytogenetic abnormalities	46,XY[20]	11 (28%)	7 (26%)	1 (8%)
	46,XX[20]	13 (33%)	7 (26%)	1 (8%)
	del5q	2 (5%)	1 (4%)	
	del 20q		1 (4%)	
	46,XY del(5)(q21q33) [17]	1 (3%)		
	46,XX,del(20)(q12)		1 (4%)	
	46,XX,i(14)(q10) [9]		1 (4%)	
	46,XX (11q23)		1 (4%)	
	47,XX,+8 [9]		1 (4%)	
	47,XX,+8,i(17)(q10) [9]			
	46,XXdel(5)(q21q33) [12]			1 (8%)
	46,XY,-18,+r(?) [21]	12 (31%)	7 (26%)	1 (8%)
	46,XY,-4,der(7)t(7;?)(q12;?),+1 mar, [15]			1 (8%)
	Monosomy 7			3 (25%)
	Complex karyotype			3 (25%)
	Not available			1 (25%)

WHO, World Health Organization; RA, refractory anaemia; RARS, refractory anaemia with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopaenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; 5q SD, 5q-syndrome; RAEB-1, refractory anaemia with excess blast type 1; RAEB-2, refractory anaemia with excess blast type 2. Platelet count and volume are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. \*Significant difference ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA with the Dunn's multicomparison test) between intermediate/high and low risk group.

## Assay of reticulated platelets

Reticulated platelets (RP) were measured by a previously described method (9). Briefly, after PRP preparation, platelets were fixed in 1% formaldehyde for 15 min at RT to minimise non-specific staining and were then resuspended in phosphate-buffered saline. Fifty microlitres of this suspension was mixed with 5  $\mu$ l of PE- $\alpha$ IIb mAb (ByoCytex, Marseille, France) and incubated for 30 min at RT. Next, 600  $\mu$ l of PBS, and 100  $\mu$ l of Retic-COUNT (thiazole orange; BD, San Jose, CA, USA) were mixed and incubated for 2 hours at RT in the dark. Samples were analysed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and 20,000 events in platelet region were acquired.

## Determination of microparticle (MP) and plasma procoagulant activities

For these determinations citrated blood was centrifuged at 1,500 *g* for 15 min at 23°C. PPP was collected and subjected to two additional centrifugations at RT (first: 15 min at 1,500 *g*, second: 2 min at 13,000 *g*).

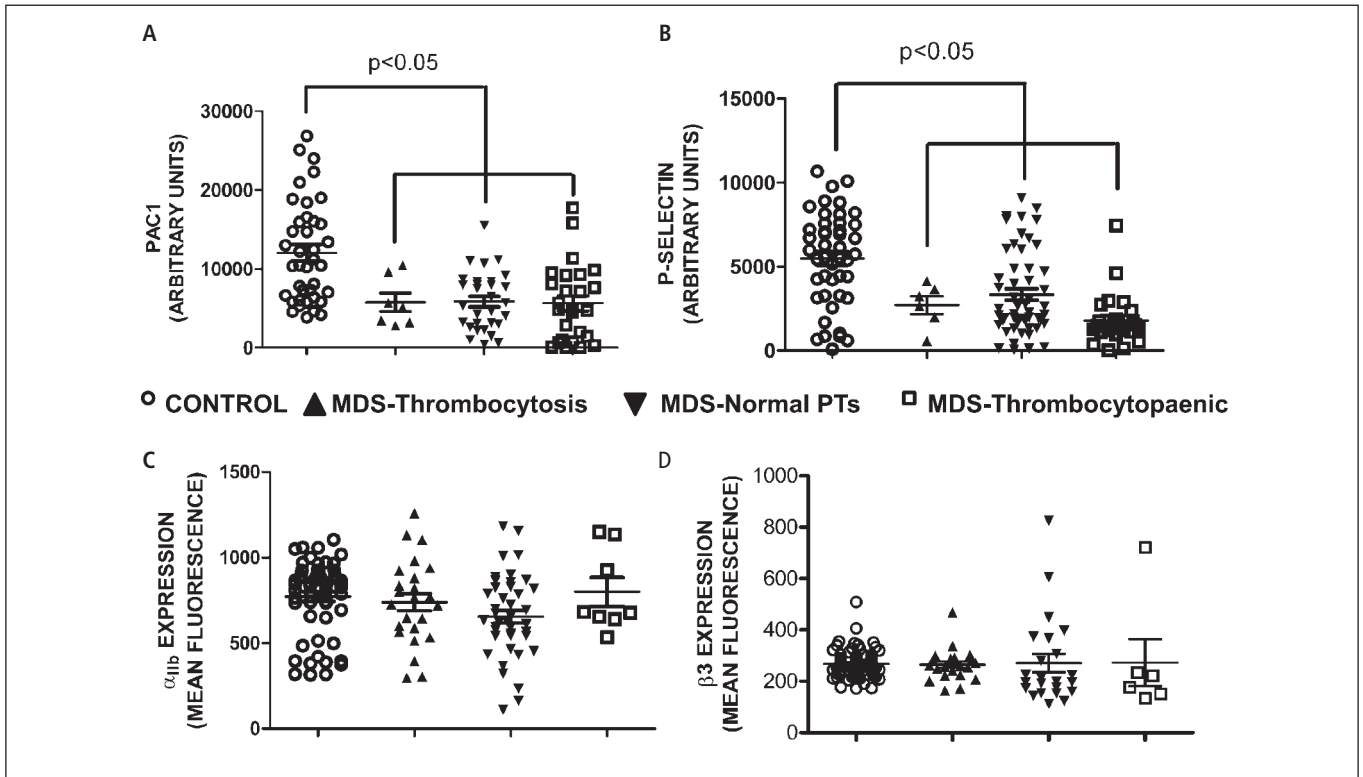
MP procoagulant activity was determined with the ZY-MUPHEN MP-Activity kit (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France) following manufacturer's instructions. This kit is based on a prothrombinase assay after microparticle capture on a micro-titration plate coated with streptavidin and biotinylated annexin V.

Plasma thrombin generation was measured using the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) method as described by Hemker et al. (10) at a final concentration of 1 pM tissue factor and 4  $\mu$ M phospholipids (PPP-Reagent LOW, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). Thrombin progress curves were recorded continuously with a Fluoroskan FL instrument (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) under the control of Thrombinoscope software version 3.6 (Thrombinoscope BV), filtered for excitation at 390 nm and emission at 460 nm. Raw fluorescence data were converted to thrombin activity against time by the same Thrombinoscope software. All assays were run in duplicate. CAT evaluates four parameters of thrombin generation: endogenous thrombin potential (ETP, total amount of thrombin generated over time), lag time (time to the beginning of the explosive burst of thrombin generation), peak height (maximum thrombin concentration produced) and time to peak.

## Statistics

Statistical analysis of the experimental data was performed by the Biostatistics Unit of La Paz University Hospital with SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For comparison of multiple groups, one-way ANOVA with the Dunn's multicomparison test was performed. Comparison of the media of two groups were performed with the Mann-Whitney test. Correlations were calculated with Pearson or Spearman tests depending on sample distribution.





**Figure 1: Surface expression of platelet activation markers and fibrinogen receptor in MDS evaluated by flow cytometry.** Platelets from healthy controls and from MDS patients were stimulated with TRAP and then binding of FITC-PAC1 (A) and FITC-anti-P-selectin mAb were assayed (B) and represented according platelet count. Data were expressed as arbitrary units

(mean fluorescence X % of positive cells). One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed and  $p < 0.05$  was considered significant. C) Fibrinogen receptor subunits  $\alpha_{IIb}$  and  $\beta_3$  were determined with the respective specific PE- and FITC-mAbs. Results were expressed as mean fluorescence. Each symbol represents an individual person.

## Results

### Platelet count, MPV and platelet mass in IPSS-stratified MDS patients

Mean platelet count was significantly decreased in the intermediate I-risk and H-risk groups but no differences in MPV were observed between groups (► Table 1). I-risk and H-risk patients had a significant decrease in platelet mass and the proportion of low mass platelets rose as IPSS score worsened (► Table 1).

### Functional state of platelets from MDS patients

Regardless of platelet count, platelets from MDS patients bound less PAC1 (► Figure 1A) and expressed reduced levels of P-selectin (► Figure 1B) in comparison to controls after stimulation with TRAP and with ADP (data not shown). A significant correlation was observed between activation markers expressed on the surface of circulating platelets after stimulation with TRAP and platelet count (Spearman test  $r = 0.354$ ,  $p < 0.05$  for PAC1 binding and  $r = 0.446$ ,  $p < 0.0001$  for P-selectin exposure). Thus, MDS patients with the lowest platelet count showed the most pronounced decrease in platelet activation. In quiescent platelets no differences

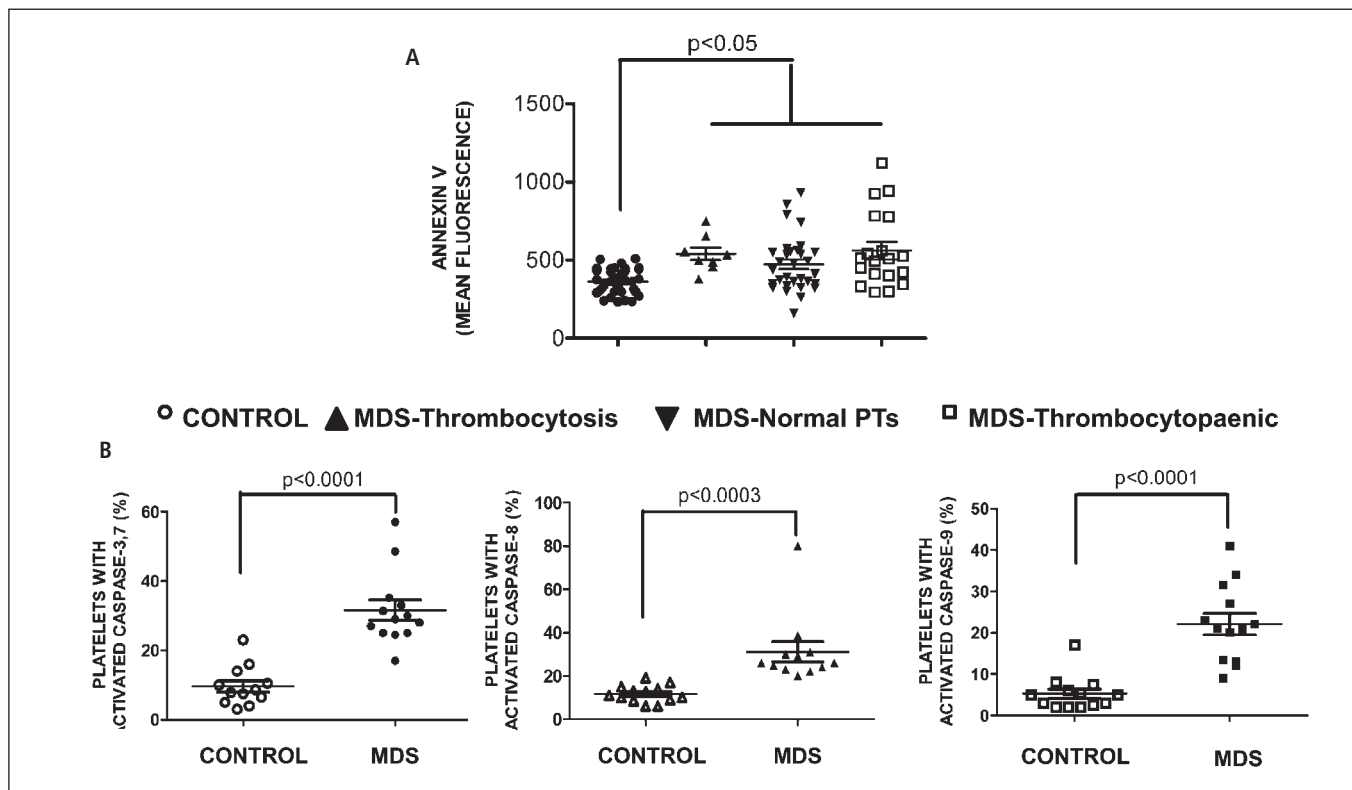
were observed in the expression of activation markers between control and MDS groups.

The impairment in platelet activation was not mediated by changes in the surface level of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  since expression was similar in control and MDS groups (► Figure 1C). Taken together, these results indicate that platelets from MDS patients show a reduced stimulation capacity that is more pronounced in platelets from patients with thrombocytopenia.

### Apoptotic features of platelets from MDS patients

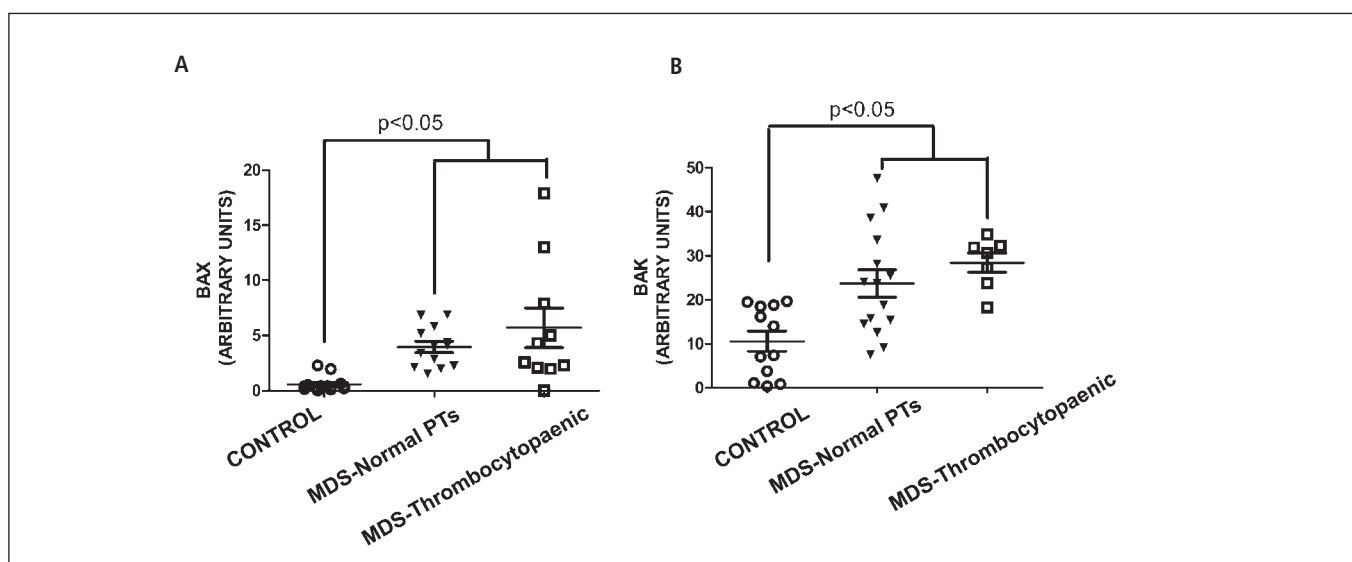
Platelets from all MDS patients, even those with a normal platelet count, exposed more PS than controls (► Figure 2A). To determine if PS exposure in this case was related to apoptosis, levels of activated caspases-3, -7, -8 and -9 were evaluated in a group of MDS patients with normal platelet count. A significantly higher proportion of platelets from MDS patients contained activated caspases -3, -7, -8 and -9 (► Figure 2B).

Moreover, MDS patients showed increased Bax and Bak levels (► Figure 3); Bax with a strong positive correlation with the AnnexinV binding values (► Figure 4A). On the other hand, AnnexinV binding and Bax expression showed an inverse correlation with platelet count (► Figure 4B, C).



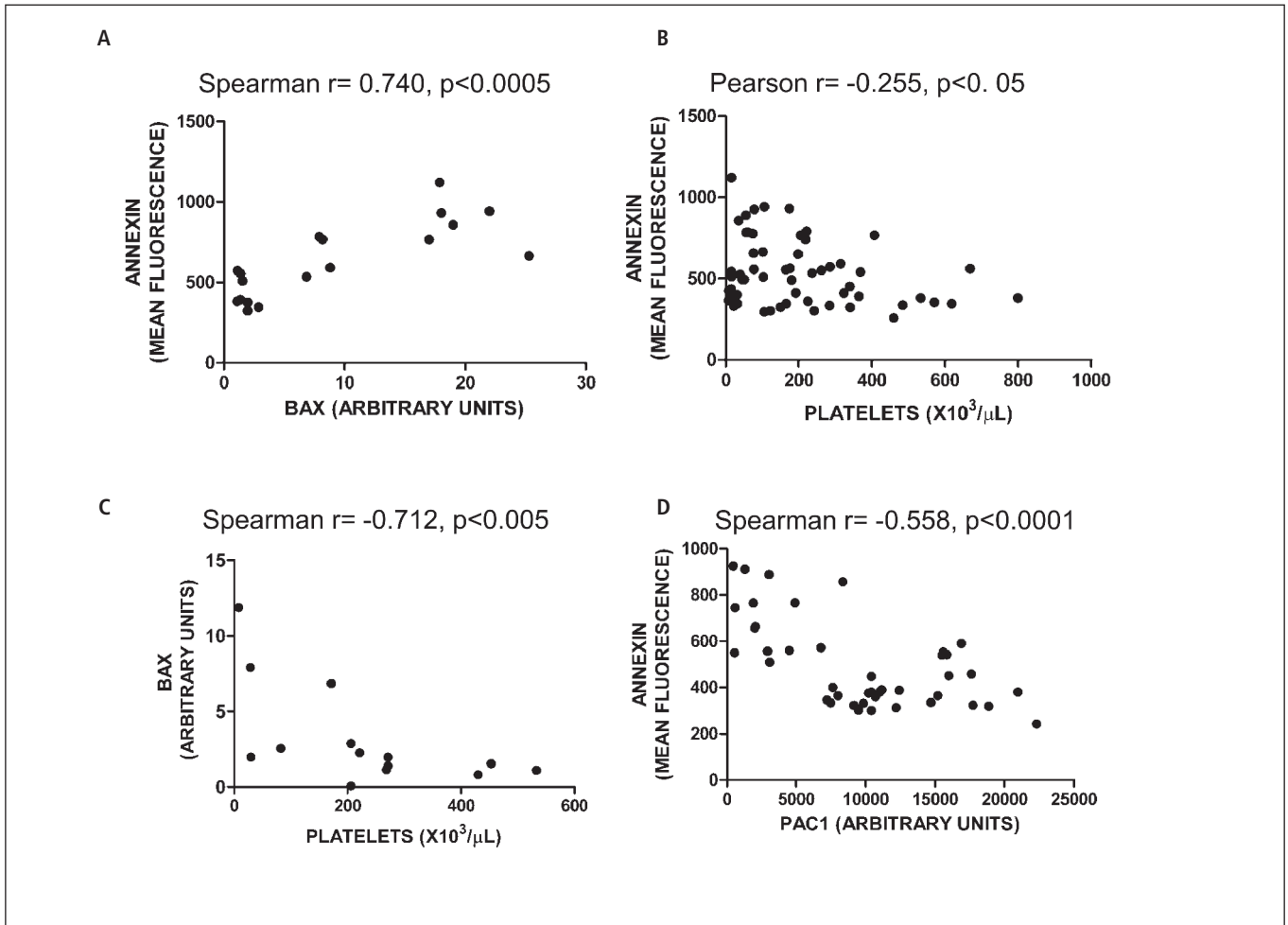
**Figure 2: Presence of apoptotic signals in platelets from controls and MDS patients.** A) PS surface expression in quiescent platelets from controls and MDS patients classified according to platelet count was determined by binding of FITC-Annexin V and flow cytometry analysis. Data were

expressed as mean fluorescence. B) Platelet-activated caspases -3, -7, -8 and -9 were determined by flow cytometry as described in *Methods*. Either one-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test (A) or Mann Whitney test (B) were performed and  $p < 0.05$  was considered significant.



**Figure 3: Expression of apoptotic proteins in platelets from controls and MDS patients.** A and B) Platelet lysates (30  $\mu$ g) were analysed by western blot for the presence of Bax and Bak as described in *Methods*. One-way

ANOVA and Dunn's multiple comparison tests were performed and  $p < 0.05$  was considered significant.



**Figure 4: Relationship between apoptosis and platelet activation ability.** A) Correlation between PS FITC-Annexin V and Bax expression. B) Correlation between FITC-Annexin V and C) Bax expression with platelet count. D) Correlation is shown between FITC-Annexin V binding to platelets

in basal conditions and FITC-PAC1 binding after stimulation with TRAP in MDS. Data was analysed with Pearson or Spearman test depending on their distribution and  $p < 0.05$  was considered significant.

Impairment in platelet function significantly correlated with platelet surface exposure of PS (► Figure 4D).

### Plasma TPO levels and immature platelets in MDS patients

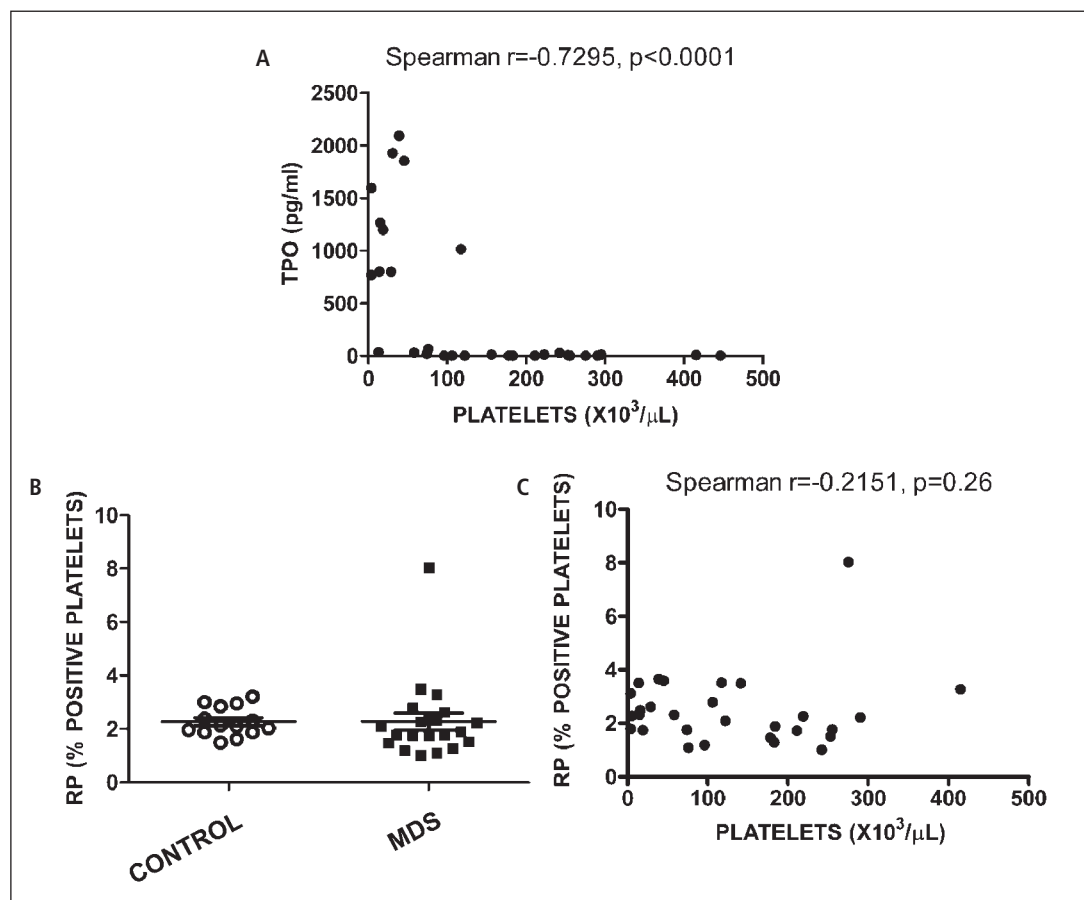
Plasma TPO levels are increased in cases of hypoplastic thrombocytopenia (11, 12) and this elevation in plasma may indicate reduced platelet production. On the other hand, the increase in immature RPs in circulation implies platelet production (13). Thus, we evaluated these parameters to elucidate megakaryopoiesis status in our cohort of MDS patients. Plasma TPO levels were inversely correlated with platelet count (► Figure 5A). However, the number of circulating RPs was similar to controls (► Figure 5B) and no correlation with platelet count was observed (► Figure 5C).

### Procoagulant MP- and plasma-associated activities

We observed an increased procoagulant activity associated with MP in MDS patients with thrombocytopenia (► Figure 6A). MP-associated procoagulant activity significantly correlated with PS exposure in platelet surface (► Figure 6B). Plasma procoagulant activity evaluated by CAT did not show differences between patients and controls in any of the measured parameters. ► Figure 6C shows ETP values that are representative of these CAT determinations.

### Discussion

In this study we evaluated characteristics of platelets from MDS patients, and we found that they presented an impaired capacity of



**Figure 5: RP and platelet count.** A) Inverse correlation between TPO and platelet count. B) Immature RP were determined by flow cytometry as referred in *Methods* and are shown as %. C) Relationship between RP and platelet count.

being stimulated and an augmented expression of apoptosis markers independently of the platelet count.

A consensus has emerged that thrombocytopenia is responsible for the haemorrhagic tendency observed in patients with MDS, but some authors have pointed out that other platelet features, such as mass, can also provide valuable information regarding prognosis in MDS patients (14, 15). Data from our cohort of patients seem to uphold this proposal because patients with a high IPSS risk score presented thrombocytopenia and the highest percentages of low platelet mass (► Table 1). However, since we did not observe significant variations in platelet volume between groups, the differences observed in platelet mass seemed to reflect platelet count. Moreover, we did not find an association between platelet mass and bleeding tendency (data not shown).

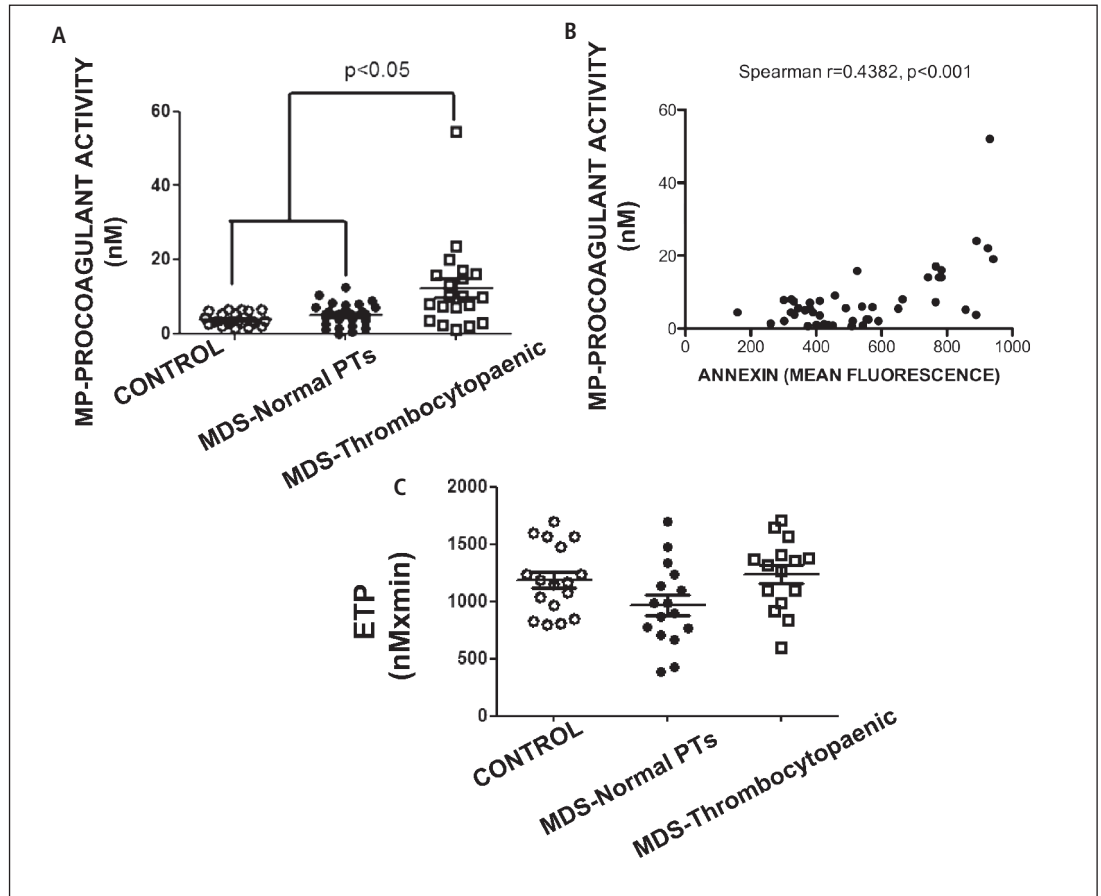
Platelet capacity for activation is another characteristic to be considered regarding the bleeding outcome in these patients. Previous studies report defective platelet aggregation in MDS patients (16, 17), and our results indicated an impairment in platelet activation induced by agonists evaluated through fibrinogen receptor activation and P-selectin surface expression in all MDS patients, even in those with normal platelet count (► Figure 1A and B). This decrease in platelet activation ability was not due to a decrease in surface expression of fibrinogen receptors (► Figure 1C). Sandes et al. (18) also reported no significant changes in fibrinogen

receptors, although there was a decreased expression of CD36, the thrombospondin receptor, in platelets from MDS patients. Nevertheless, CD36 underexpression is not responsible for the impaired platelet activation since it has been demonstrated that CD36 deficiency does not impede platelet activation by agonists (19).

Megakaryocyte growth and platelet production are controlled by TPO (20, 21). We found that TPO levels were increased only in the thrombocytopenic MDS patients. Opposite results were reported by Tamura and Ogata (22) who found increased TPO plasma concentrations in all MDS patients regardless their platelet count.

Once platelets have been released into circulation they retain detectable RNA levels for a short period of time. Count of these immature platelets is used as a marker of platelet turnover, which increases dramatically in cardiovascular disease, immune thrombocytopenia and myeloproliferative diseases (23, 24). It has been suggested that determination of the immature platelet fraction may be clinically useful in the assessment of the prognosis for MDS patients since those with thrombocytopenia and  $\geq 10\%$  RPs tended to show a higher incidence of clinical improvement than those with a lower percentage of RPs (25). Nevertheless, we did not find increases in the quantity of RP in MDS patients whatever their platelet count was. Simultaneous analysis of plasma TPO lev-

**Figure 6: Procoagulant capacity in MDS patients.** A) Microparticle (MP)-associated procoagulant activity was determined with ZYMUPHEN MP-Activity kit. B) Correlation is shown between MP-associated procoagulant activity and FITC-Annexin V binding to platelets. Data was analysed with Spearman test and  $p < 0.05$  was considered significant. C) Plasma procoagulant activity was measured by calibrated automated thrombography (CAT) and ETP is shown. Detailed procedures are explained in *Methods*.



els and RP percentages in our cohort of MDS patients showed a pattern that is characteristic of hypoplastic thrombocytopenia (26). This observation is supported by the report that indicates that increased destruction of megakaryocytes through caspase-3- and caspase-8-independent necrosis-like programmed cell death in MDS patients' bone marrow (6).

Platelets can suffer cell death via apoptosis triggered by extrinsic or intrinsic events (27). During apoptosis through the intrinsic pathway, functional loss of the prosurvival protein Bcl-xL liberates the pro-apoptotic molecules Bak/Bax which, in time, activate caspases (28). Caspases are cysteinyl aspartate proteases responsible for surface expression of clearance signals such as external exposure of phosphatidylserine (29). We observed that platelets from MDS patients showed significantly higher PS surface exposure and levels of activated caspases -3, -7, -8 and -9. Exposure of PS was accompanied by increases in endogenous Bak and Bax levels. Moreover, the lower the platelet count, the higher the expression of PS and Bax observed in platelets from MDS patients. This observation agrees with reports indicating that genetic deletion of Bak and Bax extended platelet life span and that ABT-737 and ABT-263, potent inhibitors of Bcl-xL (30), caused decreases in circulating platelet count by a Bak and Bax-dependent mechanism in animal models and humans (31, 32).

PS exposure on platelet surfaces has also been reported to occur after platelet activation with agonists (33). This did not seem to be our case since platelets from MDS patients had less activation capacity than controls. Moreover, our results pointed to an inverse correlation between PS exposure and fibrinogen receptor activation in platelets, indicating an association between apoptosis and functional impairment in platelets from MDS patients. In agreement with these results, it has recently been reported that inhibiting Bcl-xL in mice by ABT-263 administration caused a functional down-regulation of integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 activation in platelets expressing high PS levels (34).

Despite the relatively high incidence of platelet dysfunction, bleeding in MDS patients is not as common as expected, and the episodes tend to be mild. Zeiden et al. reported abnormalities in platelet aggregation in 70% of MDS patients studied but only 23% presented haemorrhagic symptoms (35). Similarly, we found that most of our patients did not show clinical bleeding manifestations and only few of them needed platelet transfusional support (► Table 1). Consequently we tested whether there was a compensatory mechanism that counteracted the decreased platelet function in MDS patients. As mentioned above, platelets from MDS patients exposed more PS in quiescent conditions than controls (► Figure 2A). External exposition of PS in cells as a consequence of scramblase activation offers a catalytic surface for several coagu-

### What is known about this topic?

- Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of haematopoietic disorders with clonal bone marrow anomalies.
- Growth of the anomalous clone produces impairment in cellular differentiation and function resulting in dysfunctional mature blood cells or/and in one or more peripheral cytopaenias.

### What does this paper add?

- Platelet function was undermined in patients with MDS and this impairment seemed to be related to increased apoptosis. This observation holds true even in platelets from MDS patients with normal platelet count.
- The lower the platelet count, the greater the apoptosis signs and the less platelet activation observed. These findings appear to reflect that MDS is a stem cell disorder, and so both number and function of progeny cells is affected.
- We want to point out the importance of determining platelet pro-apoptotic state and haemostatic function when evaluating therapeutic options to MDS patients because most treatments may cause thrombocytopenia.

lation enzyme complexes that enhance the coagulation process and accelerate thrombus formation (36-38). Moreover, lipid scrambling is accompanied by membrane blebbing and production of PS-exposing procoagulant MP shed from the plasma membrane (39-41). In light of this phenomenon, we studied cellular MP-associated procoagulant activity and observed that it was increased in MDS patients with thrombocytopenia and that it significantly correlated with PS exposure on platelet surface. This result is in accordance with the fact that platelets from MDS patients with thrombocytopenia expressed the highest levels of apoptosis signs, so they are more disposed of having released MPs. On the other hand, no differences appeared in plasma thrombogenic capacity between patients and controls. Our results showed that platelet function was undermined in patients with MDS and that this impairment seemed to be related to increased apoptosis. Moreover, platelet dysfunction and apoptosis is more pronounced in patients with thrombocytopenia, appearing to reflect that MDS is a stem cell disorder, and so both, number and function of progeny cells, is affected. This observation is in accordance with the fact that MDS patients have a defect in the differentiation of bone marrow multipotent progenitor cells that result in the production of dysfunctional mature blood cells (6) as has been extensively described for neutrophils (42-44). In addition, we want to draw attention to the importance of the platelet pro-apoptotic state and haemostatic function when evaluating therapeutic options because most treatments for MDS, such as decitabine (45), tipifarnib (46), lenalidomide (47), sirolimus (48) and azacitidine (49) may cause thrombocytopenia.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the skilful collaboration of the nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Haematology Unit of La Paz University Hospital. This work was supported by grants from FIS MS08/00182 (NVB) and PS09/00531 (NVB). NVB holds a Miguel Servet tenure-track grant from FIS and EGA-S a Ramón y Cajal grant from the Spanish MEC.

### Conflicts of interest

None declared.

### References

1. Aul C, Giagounidis A, Germing U. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol* 2001; 73: 405-410.
2. Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 136-161.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-199.
4. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-2302.
5. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-2088.
6. Gonzalez-Porras JR, Cordoba I, Such E, et al. Prognostic Impact of Severe Thrombocytopenia in Low-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Cancer* 2011; 117: 5529-5537.
7. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJJ, et al. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* 2005; 105: 3472-3479.
8. Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 214-217.
9. Hayashi S, Oshida M, Kiyoi T, et al. Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Rinsho Ketsueki* 1999; 40: 205-212.
10. Hemker HC, Giesen PLA, Ramjee M, et al. Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma. *Thromb Haemost* 2000; 83: 589-591.
11. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, et al. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996; 76: 156-160.
12. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996; 87: 4068-4071.
13. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75: 116-121.
14. Bowles KM, Warner BA, Baglin TP. Platelet mass has prognostic value in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2006; 135: 198-200.
15. Germing U, Platzbecker U, Giagounidis A, et al. Platelet morphology, platelet mass, platelet count and prognosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2007; 138: 396-403.
16. Girtovitis FI, Ntaios G, Papadopoulos A, et al. Defective Platelet Aggregation in Myelodysplastic Syndromes. *Acta Haematol* 2007; 118: 117-122.
17. Raman BK, Van Slyck EJ, Riddle J, et al. Platelet function and structure in myeloproliferative disease, myelodysplastic syndrome, and secondary thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 647-655.
18. Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2012; 97: 895-902.
19. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med*. 2007; 13: 1086-1095.
20. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11104-11108.

21. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995; 86: 419-431.
22. Tamura H, Ogata K, Luo S, et al. Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998; 103: 778-784.
23. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008; 99: 930-935.
24. Monteagudo M, Amengual MJ, Munoz L, et al. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM* 2008; 101: 549-555.
25. Saigo K, Takenokuchi M, Imai J, et al. Usefulness of immature platelet fraction for the clinical evaluation of myelodysplastic syndromes. *Lab Hematol* 2009; 15: 13-16.
26. Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasmaglycocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 656-664.
27. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231-241.
28. Kodama T, Takehara T, Hikita H, et al. BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. *J Biol Chem* 2011; 286: 13905-13913.
29. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007; 128: 1173-1186.
30. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435: 677-681.
31. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol* 2010; 11: 1149-1159.
32. Tse C, Shoemaker AR, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; 68: 3421-3428.
33. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* 2009; 114: 663-666.
34. Schoenwaelder S, Jarman KE, Gardiner EE, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 2011; 118: 1663-1674.
35. Zeidman A, Sokolover N, Fradin Z, et al. Platelet function and its clinical significance in the myelodysplastic syndromes. *Hematol J* 2004; 5: 234-238.
36. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 266-275.
37. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys Acta* 1999; 1439: 317-330.
38. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002; 88: 186-193.
39. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, et al. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 17049-17057.
40. Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, et al. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1026: 153-160.
41. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 156-164.
42. Fuhler GM, Knol GJ, Drayer AL, et al. Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 257-266.
43. Fuhler GM, Blom NR, Coffey PJ, et al. The reduced GM-CSF priming of ROS production in granulocytes from patients with myelodysplasia is associated with an impaired lipid raft formation. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 449-457.
44. Fianchi L, Leone G, Posteraro B, et al. Impaired bactericidal and fungicidal activities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2012; 36: 331-333.
45. Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld C, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2006; 106: 1794-1803.
46. Fenaux P, Raza A, Mufti GJ, et al. A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2007; 109: 4158-4163.
47. List A, Kurtin S, Roe DJ, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352: 549-557.
48. Platzbecker U, Haase M, Herbst R, et al. Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome-results of a pilot study. *Br J Haematol* 2005; 1285: 625-630.
49. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429-2440.





# **10. COMUNICACIONES A CONGRESOS**





**EL COMITÉ CIENTÍFICO** del LV CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA Y EL XXIX CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA

### **CERTIFICA QUE:**

La comunicación científica CO- 78 titulada:

**Apoptosis y capacidad de activación de las plaquetas en pacientes con síndromes mielodisplásicos**

de la que son autores:

*Mónica Martín Salces(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz) Raquel de Paz(Hospital Universitario La Paz) Víctor Jiménez-Yuste(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz) Ihosvany Fernández Bello(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz) Elena García Arias Salgado(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz) María Teresa Álvarez(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz) Nora V. Butta(Hospital Universitario La Paz-IDIPaz)*

Ha sido presentada en sesión de COMUNICACIONES ORALES dentro del LV CONGRESO NACIONAL SEHH-XXIX CONGRESO NACIONAL DE LA SETH, celebrados en Sevilla, los días 17 al 19 de octubre de 2013.

Dr. Marcos González  
Presidente Comité Científico

Dr. Javier Batlle  
Vicepresidente Comité Científico





Leading the way in experimental and clinical research in hematology

[Advanced Search](#)

Advertisement

**ASH<sup>®</sup> Meeting on Lymphoma Biology**  
June 18-21, 2016 • Colorado Springs, CO

Discuss the latest breakthroughs in basic and translational lymphoma research

**REGISTER NOW >>>**

Home | About *Blood* | Authors | Submit to *Blood* | Subscriptions | Classifieds | [f](#) [t](#) [in](#)

Current Issue | First Edition | Collections | All Issues | Abstracts | Video Library

Home / November 19, 2010; Blood: 116 (21)

**i** No markup for post-processing

## Platelet Apoptosis and Agonist Mediated Activation In Myelodysplastic Syndromes

Nora V. Butta\*, Raquel de Paz\*, Mónica Martín Salces\*, Ihosvany Fernández Bello\*, Elena G. Arias Salgado\*, Mayte Álvarez Román\*, Isabel Rivas\*, Ana Rodríguez de la Rúa\*, and Víctor Jiménez-Yuste\*

+ [Author Affiliations](#)

**Article** | Info & Metrics | E-Letters | PDF

### Abstract

#### Abstract 1866

Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise distinct disorders characterized by dysplastic and ineffective hematopoiesis that seems to be related to an increased apoptosis of bone marrow cells (Nimer, *Blood* 111: 4841, 2008). Clinical manifestations in MDS range from a diverse degree of anemias, leuko- or thrombocytopenias to severe transfusion-dependent peripheral pancytopenias. Thrombocytopenia and platelet dysfunction contribute to hemorrhagic complications observed in MDS. Many of the features of apoptosis such as membrane fragmentation, microvesiculation and phosphatidylserine (PS) exposure are observed during platelet activation to a procoagulant state, raising the possibility that apoptosis may regulate platelet function.

The aim of this work was to determine whether a correlation exists between apoptosis and activation processes in platelets from MDS patients.

Twenty six patients diagnosed MDS and classified according to WHO-2008 were included: 6 with refractory anemia (RA), 7 with RA with ringed sideroblasts (RARS), 6 with refractory RA with excess blasts-1 (RAEB-1) and 7 with cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) associated with isolated 5q deletion. Twenty six healthy donors were included as control group.

Apoptosis was determined by flow cytometry analysis through FITC-annexin V binding to platelet membrane PS exposed under basal conditions and after stimulation with a PAR-1 receptor agonist (TRAP, SFLLRN, thrombin receptor-activating peptide 6). Levels of pro- apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins were determined by densitometric analysis of western blots performed with platelet lysates.

Platelet activation was determined through FITC-fibrinogen, FITC-PAC-1 (a

Advertisement

**blood**  
**Review SERIES**

**READ NOW**

The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classifications  
Myeloid neoplasms & acute leukemia | Lymphoid neoplasms

November 19, 2010 [Table of Contents](#)

← [Previous](#)

**Volume:** 116  
**Issue:** 21  
**Pages:** 1866 - 1866  
**DOI:** <http://dx.doi.org/>

[Email](#)

[Save to My Folders](#)

[Citation Alert](#)

[Request Permissions](#)

[Correction Alert](#)

[Share](#)

[Citation Tools](#)

**Article**

**Info & Metrics**

**E-Letters**

mAb that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor) and FITC-P-selectin mAb binding to quiescent and 100 mM TRAP activated platelets by flow cytometry. Surface expression of fibrinogen receptor (αIIb and β3 subunits) was determined by flow cytometry with specific mAbs.

Platelets from RA, RARS and RCMD patients expressed more PS than control ones under basal conditions (p<0.05) as well as after 100 mM TRAP stimulation (p<0.05). Moreover, platelets from these MDS patients expressed more Bax protein than control group (p<0.05).

On the other hand, PS exposure and Bax content in platelets from RAEB-1 patients were similar to controls, but they expressed a higher amount of Bcl-2 (p<0.05). No correlation was observed between PS exposure or Bax expression and platelet number.

Platelets from all MDS patients showed an impaired activation by TRAP, even when PS exposure was higher than in control group. This diminished response to TRAP was not due to a reduction in surface expression of fibrinogen receptor in platelets from MDS patients.

Our results suggest that platelets from RA, RARS and RCMD patients are more apoptotic than control ones and that a correlation between platelet surface PS and activation does not seem to exist. Moreover, dissimilarity in expression pattern of apoptotic proteins among MDS types indicates differences in the intracellular mechanisms underlying these pathologies.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

© 2010 by The American Society of Hematology

[^ Back to top](#)

[Related Articles](#) -

No related articles found.

[Cited By...](#) +

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Jiménez-Yuste, V.](#)

Articles by [Butta, N.](#)

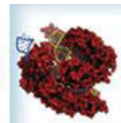
Articles by [Jiménez-Yuste, V.](#)

Advertisement

Advertisement



**ASH® WORKSHOP ON GENOME EDITING**  
JULY 14-15, 2016 • WASHINGTON, DC



Join researchers, clinicians, regulators, and industry scientists.  
**REGISTER NOW**



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

**American Society of Hematology**  
2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036  
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

[Current Issue](#)

[First Edition](#)

[Subscriptions](#)

[About Blood](#)

[Submit to Blood](#)

[Alerts](#)

**Information for:**

[Authors](#)



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

[Advanced Search](#)

Advertisement



How will you treat your patients with the latest available agents?  
LEARN FROM THE EXPERTS.



Watch "How I Treat" webcasts

Home	About <i>Blood</i>	Authors	Submit to <i>Blood</i>	Subscriptions	Classifieds	f	twitter	in
Current Issue	First Edition	Collections	All Issues	Abstracts	Video Library			

Home / November 18, 2011; Blood: 118 (21)

## Platelet Functions and Risk Prognosis in Myelodysplastic Syndromes,

Nora V. Butta, PhD<sup>\*,1</sup>, Mónica Martín Salces, MD<sup>\*,1</sup>, Raquel de Paz<sup>\*,1</sup>, Elena G. Arias Salgado, PhD<sup>\*,1</sup>, Ihosvany Fernández Bello<sup>\*,1</sup>, Mayte Álvarez Román, MD<sup>\*,1</sup>, Isabel Rivas, MD<sup>\*,1</sup>, Miguel Canales, MD, PhD<sup>2</sup>, and Víctor Jiménez-Yuste, PhD<sup>\*,1</sup>

+ [Author Affiliations](#)

[Article](#) [Info & Metrics](#) [E-Letters](#) [PDF](#)

### Abstract

#### Abstract 3806

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogenous group of clonal stem cell disorders with peripheral cytopenias and increased incidence of leukemic transformation.

The prognosis of MDS is determined by several factors, including the presence of specific cytogenetic abnormalities, the percentage of blastoid cells in bone marrow and peripheral blood, the number of affected cell lineages, and transfusion dependency. The most commonly used risk stratification system is the International Prognostic Scoring System (IPSS). This score divides patients into a lower risk subset (low and intermediate-1) and a higher risk subset (intermediate-2 and high).

Patients with MDS may have hemorrhagic complications with serious outcomes that are among the major causes of death in this population. These bleeding episodes that are often related to thrombocytopenia also occur in MDS patients with normal platelet count.

The aim of this work was to study functional characteristics of platelets in MDS patients and their relationship to risk evaluated as indicated by IPSS.

Eighty diagnosed MDS patients risk-stratified according to IPSS were included: 40 with low-risk, 29 with intermediate-1-risk (I-1), 8 with intermediate-2-risk (I-2) and 3 with high-risk. Eighty healthy donors were included as control group.

Platelet-related primary haemostasis was evaluated with an automated platelet function analyzer (PFA-100<sup>®</sup>, Siemens Healthcare Diagnostics). Samples of citrated blood were aspirated under a shear rate of 4,000–5,000/s through a 150- $\mu$ m aperture cut into a collagen-ADP (COL-ADP) or collagen-epinephrine (COL-EPI) coated membrane. The platelet haemostatic capacity is indicated by the time required for the platelet plug to occlude the aperture (closure time, CT), which is expressed in seconds.

Advertisement



November 18, 2011 [Table of Contents](#)

← [Previous](#)

Volume: 118  
Issue: 21  
Pages: 3806 - 3806  
DOI: <http://dx.doi.org/>

- [Email](#)
- [Save to My Folders](#)
- [Citation Alert](#)
- [Request Permissions](#)
- [Correction Alert](#)
- [Share](#)
- [Citation Tools](#)

[Article](#)

[Info & Metrics](#)

[E-Letters](#)

[Related Articles](#) -

Platelet activation was determined through FITC-PAC-1 (a mAb that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor) and FITC-P-selectin mAb binding to quiescent and 100  $\mu$ M TRAP activated platelets by flow cytometry. Surface expression of fibrinogen receptor ( $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 subunits) was determined by flow cytometry with specific mAbs.

Apoptosis was determined by flow cytometry analysis through FITC-annexin V binding to platelet membrane phosphatidylserine (PS) exposed in basal conditions.

I-2 and high-risk patients were gathered together in a high-risk group in order to analyze experimental results. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Tukey test.

CTs obtained with COL-EPI and COL-ADP cartridges in controls and low risk patients were similar and significantly shorter than CTs observed in I-1-risk and high-risk MDS patients ( $p < 0.05$ ).

Platelets from all MDS patients showed a reduced capability for being activated by 100  $\mu$ M TRAP. This impairment was more evident in I-1-risk and high-risk patients: PAC-1 binding, in arbitrary units (AU), was  $11368 \pm 1017$  in controls;  $7849 \pm 789$  in low-risk MDS ( $p < 0.05$ );  $4161 \pm 591$  in I-1-risk MDS ( $p < 0.01$  versus control and  $p < 0.05$  versus low-risk) and  $492 \pm 184$  in high-risk MDS ( $p < 0.01$  versus control and  $p < 0.05$  versus low-risk). The platelet surface expression of P-selectin induced by 100  $\mu$ M TRAP was also reduced:  $5102 \pm 340$  AU in controls,  $3318 \pm 400$  AU in low-risk MDS ( $p < 0.05$ );  $1880 \pm 197$  AU in I-1-risk MDS ( $p < 0.05$  versus control and versus low-risk), and  $1211 \pm 130$  AU in high-risk MDS ( $p < 0.05$  versus control and versus low-risk). Diminished responses to TRAP were not due to a reduction in surface expression of fibrinogen receptor in platelets from MDS patients.

Platelets from MDS patients expressed more PS than controls under basal conditions. Mean fluorescence values for FITC-annexin binding were:  $383 \pm 16$  in controls;  $444 \pm 21$  in low-risk ( $p < 0.05$ );  $575 \pm 52$  in I-1-risk MDS ( $p < 0.05$  versus control and versus low-risk);  $611 \pm 17$  in high-risk MDS ( $p < 0.05$  versus control and versus low-risk).

Our results indicated that platelets from MDS patients had less ability to be activated and were more apoptotic than control ones. These dysfunctions were more pronounced when the risk of the disease was higher according to IPSS.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

© 2011 by The American Society of Hematology

[^ Back to top](#)

No related articles found.

Cited By...

+

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Jiménez-Yuste, V.](#)

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Jiménez-Yuste, V.](#)

Advertisement

Advertisement



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology  
2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036  
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

[Current Issue](#)

[First Edition](#)

[Collections](#)

[All Issues](#)

[Abstracts](#)

[Subscriptions](#)

[About \*Blood\*](#)

[Newsroom](#)

[Public Access](#)

[Permissions](#)

[Submit to \*Blood\*](#)

[Alerts](#)

[RSS](#)

[Blood App](#)

[Contact Us](#)

**Information for:**

[Authors](#)

[Subscribers](#)

[Institutions/Librarians](#)

[Advertising in \*Blood\*](#)





Leading the way in experimental and clinical research in hematology

[Advanced Search](#)

Advertisement


[Home](#)
[About Blood](#)
[Authors](#)
[Submit to Blood](#)
[Subscriptions](#)
[Classifieds](#)
[f](#) [t](#) [in](#)
[Current Issue](#)
[First Edition](#)
[Collections](#)
[All Issues](#)
[Abstracts](#)
[Video Library](#)

Home / November 16, 2012; Blood: 120 (21)

## Microparticle-Associated Thrombogenic Mechanism Might Compensate Bleeding Tendency in Patients with Myelodysplastic Syndromes.

Nora V. Butta<sup>\*,1</sup>, Monica Martin Salces<sup>\*,1</sup>, Raquel de Paz<sup>\*,2</sup>, Ihosvany Fernández Bello<sup>\*,1</sup>, Mayte Álvarez Román<sup>\*,1</sup>, Miguel Canales<sup>3</sup>, and Victor Jimenez Yuste<sup>\*,1</sup>

+ [Author Affiliations](#)

[Article](#)
[Info & Metrics](#)
[E-Letters](#)
[PDF](#)

### Abstract

#### Abstract 2821

**Introduction:** Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematopoietic disorders with clonal bone marrow anomalies characterized by ineffective hematopoiesis, morphologic and functional hematopoietic cells abnormalities, and an increased risk of transformation to acute myeloid leukemia. Previous work from our lab has shown that MDS patients had an impairment in platelet activation, more externalization of phosphatidylserine (PS) indicating an increased platelet apoptosis and, in some cases, thrombocytopenia. However, these patients do not bleed at the frequency that would be expected taking into account these facts.

**Objective:** The aim of this work was to identify the existence of some compensatory mechanisms that could be counteracting the expected bleeding tendency in these patients.

Since apoptosis is accompanied by membrane blebbing and production of PS-exposing procoagulant microparticles (MP) shed from the plasma membrane, we assessed the thrombogenic capacity of MP and evaluate their correlation with exposure of PS. We also studied the ability of plasma to generate thrombin after stimulus.

**Methods:** Seventy-five patients with MDS, 36% female, mean age 77 years (range: 41 to 93 years) and sixty-eight healthy controls, 29% female, mean age 52 years (range 20 to 76 years) were included. Whole blood was collected in citrated tubes and centrifuged at 1,500 *g* for 15 min at 23°C to obtain platelet poor plasma (PPP). PPP was subjected to 2 additional centrifugations at room temperature (first: 15 min at 1,500 *g* and second: 2 min at 13,000 *g*) following SSC-ISTH recommendations to obtain platelet free plasma (PFP). MP procoagulant activity was determined in PFP with the ZYMUPHEN MP-Activity kit (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, France).

Plasma thrombin generation was measured using the Calibrated Automated

Advertisement



November 16, 2012 [Table of Contents](#)

← [Previous](#)

Volume: 120

Issue: 21

Pages: 2821 - 2821

DOI: <http://dx.doi.org/>

[Email](#)

[Save to My Folders](#)

[Citation Alert](#)

[Request Permissions](#)

[Correction Alert](#)

[Share](#)

[Citation Tools](#)

[Article](#)

[Info & Metrics](#)

[E-Letters](#)

Thrombogram (CAT) as described by Hemker at final concentration of 1pM tissue factor and 4 microM phospholipids. Four CAT parameters were recorded: endogenous thrombin potential (ETP, total amount of thrombin generated over time), lag time (time to the beginning of the explosive burst of thrombin generation), time to peak (TTP, time to reach the maximum thrombin concentration) and peak height (maximum thrombin concentration obtained). Apoptosis was determined by assessing the level of PS externalization by the binding of FITC-Annexin V to platelets by flow cytometry. Thrombocytopenia was defined as platelet count less than 50,000 platelets/microliter.

**Results:** Platelet count in MDS patients varied from 4,000 to 478,000 platelets/microliter. We observed an increased MP-associated procoagulant activity in MDS patients with thrombocytopenia compared to controls ( $p < 0.05$ ). This would be related to the increased apoptosis observed in platelets from MDS patients with thrombocytopenia (Spearman test  $r = 0.655$ ,  $p < 0.01$ ). CAT evaluation of plasma procoagulant activity did not show differences between patients and controls in any of the measured parameters.

**Conclusions:** Our results showed an increased procoagulant activity associated to plasma MPs in MDS with thrombocytopenia that might contribute to the minor risk of bleeding observed in these patients. However, further studies are necessary to assess the clinical significance of this finding.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

© 2012 by The American Society of Hematology

[^ Back to top](#)

Related Articles -

---

No related articles found.

---

Cited By... +

---

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Yuste, V.](#)

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Yuste, V.](#)

Advertisement



Explore innovative ideas for effective care for patients with hematologic malignancies.



REGISTER NOW 

Advertisement



**Consult a Colleague**  
Get advice on difficult cases from specialists in the field.



SUBMIT A REQUEST 



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

**American Society of Hematology**  
201 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036  
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

[Current Issue](#)

[First Edition](#)

[Collections](#)

[Subscriptions](#)

[About Blood](#)

[Newsroom](#)

[Submit to Blood](#)

[Alerts](#)

[RSS](#)

**Information for:**

[Authors](#)

[Subscribers](#)



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

[Advanced Search](#)

Advertisement

Enumerate Cord Blood HSPCs with the **New ALDH<sup>br</sup> Assay Kit**



- |               |                    |             |                        |               |               |   |         |    |
|---------------|--------------------|-------------|------------------------|---------------|---------------|---|---------|----|
| Home          | About <i>Blood</i> | Authors     | Submit to <i>Blood</i> | Subscriptions | Classifieds   | f | twitter | in |
| Current Issue | First Edition      | Collections | All Issues             | Abstracts     | Video Library |   |         |    |

Home / December 3, 2015; Blood: 126 (23)

## Haemostasis Impairment in Patients with Myelodysplastic Syndromes with Normal Platelet Counts

Nora Butta, PhD<sup>\*,1</sup>, Monica Martín Salces<sup>\*,2</sup>, Raquel De Paz<sup>\*,3</sup>, Ihosvany Fernandez Bello, PhD<sup>\*,2</sup>, María Teresa Álvarez Román, PhD<sup>\*,2</sup>, María Isabel Rivas Pollmar<sup>\*,2</sup>, Miguel Canales<sup>2</sup>, and Victor Jiménez Yuste, PhD<sup>\*,2</sup>

+ [Author Affiliations](#)

**Article** | [Info & Metrics](#) | [E-Letters](#) | [PDF](#)

### Abstract

**Background:** Bleeding complications can have serious outcomes in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and are usually related to thrombocytopenia. In a recent work we demonstrated that platelets from MDS have impaired capacity to respond to agonist stimulation and exposed more phosphatidylserine (PS) than those from healthy controls whichever their platelet count was (Martin *et al*, *Thromb Haemost.*, 2013;109:909-19). The exposure of PS in the outer layer of cell membranes supports coagulation through enhanced formation of the tenase (factors IXa, VIIIa and X) and prothrombinase (factors Xa, Va and prothrombin) complexes and thrombin generation. So, the possibility exists that these processes are increased in these patients.

**Objectives:** The aim of this work was to study whether thrombus formation and thrombin generation is impaired in MDS patients with normal platelet count employing global coagulation tests thromboelastometry (ROTEM) and Calibrated Automated Thrombogram (CAT).

**Methods:** Thirty-one MDS patients with normal platelet count and twenty healthy controls were included. Citrated blood was centrifuged at 152 g 10 min at 23°C for obtaining platelet rich plasma (PRP) and at 1,500 g for 15 min at 23°C for platelet-poor plasma (PPP). For ROTEM and CAT experiments, PRP was adjusted to a platelet count of  $25 \times 10^9/L$ . Aliquots for ROTEM assay were tested within the two hours after obtaining blood samples. For CAT experiments, adjusted PRP and PPP aliquots were stored at -70°C until analysis.

Kinetics of clot formation, non-activated ROTEM was performed on adjusted PRP. Clotting time (CT, time from start of measurement until initiation of clotting [in seconds], alpha angle, which reflects the rate of fibrin polymerisation (tangent to the curve at 2-mm amplitude [in degrees]), and maximum clot firmness, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus (MCF, [in mm]), were recorded.

Advertisement



December 03, 2015 [Table of Contents](#)

[← Previous](#)

Volume: 126  
Issue: 23  
Pages: 5225 - 5225  
DOI: <http://dx.doi.org/>

- |                                    |                                       |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| <a href="#">✉ Email</a>            | <a href="#">📁 Save to My Folders</a>  |
| <a href="#">🔔 Citation Alert</a>   | <a href="#">© Request Permissions</a> |
| <a href="#">🔔 Correction Alert</a> | <a href="#">↻ Share</a>               |
| <a href="#">🌐 Citation Tools</a>   |                                       |

**Article**

**Info & Metrics**

**E-Letters**

Thrombin generation was measured in adjusted PRP without any trigger and in PPP with 1 pM tissue factor and 4 μM phospholipids (PPP-Reagent LOW, Thromboscope BV, Maastricht, The Netherlands) as trigger. Endogenous thrombin potential (ETP, the total amount of thrombin generated over time); the lag time (the time to the beginning of the explosive burst of thrombin generation); the peak height of the curve (the maximum thrombin concentration produced); and the time to the peak were evaluated.

Platelet activation was determined by PAC1 (BD, Madrid, Spain) binding after stimulation with 100 μM thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) and surface PS through Annexin-V binding and flow cytometry analyses.

**Results:** Platelets from MDS patients had a reduced response to TRAP stimulation (control= 12016+6384 arbitrary units; MDS= 5829+3704 arbitrary units) and exposed more PS than controls (control= 362.1+80.5 MF; MDS= 378.5+173.5 MF).

ROTEM experiments showed kinetic parameters corresponding to a hypocoagulable profile (CT: control= 550+95 sec, MDS= 922+216 sec, p<0.01; alpha angle control= 62.8+4.3, MDS= 47.5+6.0, p<0.05; A5: control= 29.8+3.2, MDS= 24.2+5.8, p<0.05 whereas MCF was similar to controls (control= 46.7+3.1 mm, MDS= 47.5+4.3 mm).

In order to evaluate whether the impaired clot formation was due to a reduction in plasma-associated thrombin generation, CAT experiments were performed in PPP samples. No differences were found between MDS patients and control group (ETP: control=1223.4+257.8 nMxmin, MDS= 1224.4+344 .1 nMxmin; peak: control= 279.5+54.7nM, MDS= 265.9+64.1 nM). On the other hand, when thrombin generation experiments were performed in adjusted PRP, ETP and peak values were lower than in control group (ETP: control=1574.8+430.5 nMxmin, MDS= 1167.4+354 nMxmin, p<0.05; peak: control= 225.6+82.9 nM, MDS= 266.9+92.2 nM, p<0.05).

**Conclusions:** Platelet dysfunction might be responsible of bleeding complications observed in patients with MDS with normal platelet counts. Increment in PS exposure on platelet surface did not seem to compensate impairment in platelet function.

**Disclosures** No relevant conflicts of interest to declare.

- ↯\* Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2015 by The American Society of Hematology

[↶ Back to top](#)

Related Articles

No related articles found.

Cited By...

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Yuste, V.](#)

Articles by [Butta, N.](#)

Articles by [Yuste, V.](#)

Advertisement

Advertisement



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology  
2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036  
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

[Current Issue](#)

[First Edition](#)

[Collections](#)

[Subscriptions](#)

[About Blood](#)

[Newsroom](#)

[Submit to Blood](#)

[Alerts](#)

[RSS](#)

**Information for:**

[Authors](#)

[Subscribers](#)