



COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA

COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN

PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO

COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ

“PLAQUETAS: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA”

PROFESOR INVITADO: DR CARLOS EDUARDO MENDOZA-GAVIRIA

**Médico egresado de la Universidad de Los Andes, Mérida - Venezuela y
Especialista en Medicina Interna y Hematología de la Universidad Central
de Venezuela, Caracas. carlooseduardom37@gmail.com**

Introducción

Las plaquetas o trombocitos son partículas celulares, elementos formes sanguíneos. Son estructuras microscópicas que forman parte del parénquima del tejido sanguíneo, con una singular estructuración endomembranosa y un citoesqueleto que es crucial para su funcionamiento. Se originan del fraccionamiento del citoplasma de los megacariocitos, en la médula ósea. Desde el punto de vista funcional, participan principalmente en la hemostasia.

Cuando la sangre humana es extraída, pueden fabricarse concentrados plaquetarios (CP) como hemocomponentes celulares. Los CP para la terapéutica celular en medicina transfusional, convencionalmente se almacenan a una temperatura entre 22-24 °C y en permanente agitación suave, aun cuando se pueden conservar refrigerados (incluso congelados)¹ sin afectar su capacidad hemostática, aunque la supervivencia plaquetaria en la circulación se reduce.

Se han identificado tecnologías avanzadas que proporcionarán nuevos conocimientos sobre la estructura plaquetaria. Se ha acotado el término diversidad plaquetaria para la denominación de la variabilidad de estos elementos formes sanguíneos intrasujeto que, puede ser intrínseca o estar afectada por el medio ambiente y conducir a un patrón heterogéneo de respuesta en la agregación, en la formación de coágulos y en la comunicación externa. El uso de tecnologías novedosas puede proporcionar nuevos conocimientos sobre las causas subyacentes de la diversidad molecular, estructural y funcional de las plaquetas. El entendimiento de la diversidad plaquetaria, se inicia con la comprensión de los megacariocitos en proliferación con diferentes patrones de expresión de alelos específicos, la formación asimétrica de las proplaquetas, los cambios en las plaquetas inducidos por la estimulación y el envejecimiento, la heterogeneidad interplaquetaria en la organización y estabilidad de los trombos y las comunicaciones dependientes de las plaquetas. La brecha en el conocimiento actual puede acortarse utilizando tecnologías prometedoras, como la secuenciación de próxima generación, enfoques proteómicos, técnicas avanzadas de imagen, citometría de masa y de flujo multicolor, ensayos de microfluidos multifuncionales y plataformas en chips. Esta base tecnológica puede ayudar a caracterizar las poblaciones de plaquetas y a identificar biomarcadores plaquetarios relevantes para el tratamiento de algunas enfermedades en las que, las plaquetas están involucradas desde el punto de vista etiopatogénico.²

Nos pareció importante aprovechar la oportunidad, para hacer una revisión actualizada sobre la estructura (morfología descrita con microscopía fotónica), ultraestructura (rasgos morfológicos caracterizados con microscopía electrónica) y fisiología de las plaquetas, con la motivación de conocer más aspectos vinculados con estos fascinantes elementos usados frecuentemente en medicina transfusional.

Morfología estructural

Las plaquetas son elementos formes sanguíneos con aspecto lenticular, son discos biconvexos de 2 a 3 micrómetros (μm) de diámetro, carecen de núcleo porque se derivan del fraccionamiento del citoplasma de los megacariocitos. La función primaria de las plaquetas es intervenir en la hemostasia, funcionando como un parche, cuando ocurre una lesión vascular, rotura del endotelio y exposición del colágeno tipo IV subendotelial, componente estructural fundamental de la membrana basal subepitelial.

De manera secundaria, juegan un papel funcional muy importante en la angiogénesis y en la inmunidad innata.

En los humanos, la cuenta plaquetaria normal varía dentro de un amplio rango, de 150 a 400 x 10⁹/L, tienen una vida media en la circulación sanguínea de 8 a 10 días. Se derivan de la fragmentación de unos procesos dendríticos o prolongaciones citoplasmáticas circunstanciales (proplaquetas) de los megacariocitos, que se introducen en la luz de los capilares sanguíneos sinusoides del estroma de la médula ósea principalmente. Al cabo del cumplimiento de su vida media, las plaquetas son extraídas de la circulación sanguínea por el sistema monocítico macrofágico, fundamentalmente en los cordones del Billroth de la pulpa roja esplénica.

Desde el punto de vista estructural, con microscopía fotónica se observan en los extendidos o frotis sanguíneos teñidos con la coloración supravital azul brillante de cresil y con coloraciones tipo Romanovsky (por ejemplo, tinciones de Wright y de Giemsa).

Como son fragmentos del citoplasma de los megacariocitos, las plaquetas contienen un complejo sistema membranoso y organoides. Con microscopía fotónica las plaquetas circulantes se observan en dos dimensiones, poseen aspecto circular, con superficie ligeramente festoneada, en condiciones fisiológicas con tamaño uniforme (normocitosis plaquetaria), una zona heterogénea en la que se agrupa la mayoría de las estructuras membranosas intracitoplasmáticas denominada granulómero, generalmente ubicada en el centro o en posición excéntrica; y un compartimiento intracelular claro, periférico, denominado hialómero. Con azul brillante de cresil, el granulómero se observa teñido de azul violáceo, con un aspecto heterogéneo. El hialómero se observa claro y uniforme, coloreado de azul celeste, sin estructuras granulares. Con tinciones tipo Romanovsky, principalmente Wright y Giemsa, o ambas, usadas de manera secuencial, el granulómero es una estructura basófila y el hialómero es neutrófila o ligeramente acidófila, hialina.

Cuando las plaquetas se activan y se adhieren a componentes endoteliales y al tejido conectivo subepitelial, fisiológicamente cambian de forma como consecuencia de modificaciones moleculares de los elementos del citoesqueleto plaquetario. Cuando en extendidos sanguíneos, en condiciones fisiológicas, observamos plaquetas espiculadas, probablemente se trata de plaquetas activadas.³⁻⁴

Morfología ultraestructural

Las plaquetas contienen un número distinguible de elementos ultraestructurales, que incluyen: membrana plasmática bien delimitada; invaginaciones de la membrana plasmática que se introducen hacia el citoplasma, denominado sistema canalicular abierto (SCA); un sistema de canales cerrados derivado del retículo endoplasmático liso de los megacariocitos, conocido como sistema tubular denso (STD); elementos del citoesqueleto en el que hay ausencia de filamentos intermedios, una malla de espectrina en la cara protoplásmica (cara P del plasmalema) y una extensa red citoplasmática de actina; una banda circunferencial externa de microtúbulos; y numerosos organoides dentro de los que se han descrito gránulos alfa (g- α); gránulos densos (g-d), peroxisomas, lisosomas y mitocondrias.^{4,6-7,15}

Membrana plasmática

Responde a la ultraestructura de todas las membranas biológicas, una bicapa fosfolipídica que también contiene colesterol, glicolípidos y glicoproteínas. Aun cuando todas las membranas biológicas de los seres vivos eucariotas (animales y vegetales), poseen el mismo modelo ultraestructural y funcional de mosaico fluido, propuesto por Singer y Nicholson en 1972, existen diferencias de acuerdo con el tipo celular. En términos generales, el espesor de la membrana plasmática o plasmalema es de 7 a 10 nanómetros (nm), en las plaquetas mide alrededor de 20 nm. A diferencia del plasmalema de los eritrocitos, las moléculas que contienen carbohidratos se ubican principalmente hacia la cara E (cara

exoplásmica de la membrana plasmática). Además, contiene proteínas integrales transmembranales como las bombas de sodio (Na) y de calcio (Ca) dependientes de trifosfato de adenosina (en español TFA, en inglés ATP), para el control intracelular iónico en las plaquetas.

La organización asimétrica de los fosfolípidos entre la cara protoplásmica y la exoplásmica, es importante en la regulación de la coagulación. Los fosfolípidos con carga negativa, como por ejemplo el fosfatidil inositol se encuentra ubicado principalmente en el lado de la bicapa hacia el compartimento citoplasmático (protoplásmico), mantiene la superficie plaquetaria en un estado no procoagulante. La asimetría de la membrana plaquetaria dependiente de los fosfolípidos se mantiene por aminofosfolípidos-traslocasas dependientes de ATP, también denominadas flipasas (recordar el movimiento de *flip-flop* de los fosfolípidos en las membranas biológicas). Las flipasas activamente mueven los fosfolípidos con carga negativa hacia la capa interna de la bicapa lipídica y también promueven la interacción de estos fosfolípidos con elementos del citoesqueleto y del citoplasma de las plaquetas. Durante la activación plaquetaria, los aminofosfolípidos son expuestos hacia el exterior de la bicapa, por acción de las denominadas flipasas dependientes de ATP y las escramblasas, precipitando las reacciones procoagulantes fundamentadas en la interacción de las superficies celulares.

La membrana plasmática también contiene sustancias dinámicas, ricas en colesterol y esfingolípidos, microdominios llamados balsas lipídicas que desempeñan funciones importantes en la señalización y el tráfico de la comunicación intracelular de las plaquetas. Si bien carecen notablemente de caveolina, las balsas lipídicas contienen los marcadores proteicos flotilinas 1 y 2, y estomatina, así como el gangliósido GM1. Otros componentes proteicos de las plaquetas en reposo incluyen:

- CD36, una glicoproteína de membrana presente en las plaquetas, fagocitos mononucleares, adipocitos, hepatocitos, miocitos y algunos epitelios como el endotelio microvascular. El CD36 es un receptor para la trombospondina 1 y proteínas relacionadas que cumplen una función inhibitoria de la angiogénesis.
- CD63, que es un miembro de la superfamilia de las tetraspaninas de antígenos de superficie celular relacionado con la activación, que se conoce por sus niveles anormalmente altos en la superficie de los basófilos activados, en los mastocitos en proliferación y en la superficie de las células endoteliales en pacientes con tejidos inflamados.
- CD9, es una proteína transmembranal a cuatro pasos, también miembro de la superfamilia de las tetraspaninas, contiene distintos sitios de palmitoilación que permiten interactuar con lípidos y otras proteínas. Es el receptor para la GPIIb/IIIa (integrina α IIb β 3). Juega un papel crítico en la regulación de la adhesión y la agregación plaquetarias durante la hemostasia y polipéptidos plaquetarios tipo cerebral transportadores de glucosa [del inglés, *glucose uptake via glucose transporter 3* (GLUT-3)].
- Moléculas relacionadas con la activación plaquetaria como la glicoproteína VI (GPVI), un receptor miembro de la familia de los receptores que reconocen y unen la fracción cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina G (Fc γ RIIA o CD32a), conocido por sus funciones activadoras en el reconocimiento de patógenos y en la biología de las plaquetas y, como marcador potencial de los linfocitos T infectados de forma latente por VIH-1.⁵
- Glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V), que pertenece a una familia de receptores con repeticiones ricas en leucina, una señal fundamental de transducción para la agregación plaquetaria que se une con la integrina β -3 en la agregación plaquetaria (del inglés, *human-proto-oncogene tyrosine-protein kinase* o SRC y *chicken-proto-oncogene tyrosine-protein kinase* o c-SRC),⁸ los productos del ácido fosfatídico y la fosfoinositol 3-cinasa, que también intervienen en la

distribución de las balsas lipídicas, que pueden mediar en la agrupación de receptores y regular su activación.

En efecto, la membrana plaquetaria está repleta de receptores de superficie altamente específicos que regulan finamente la activación plaquetaria dependiente de una señal bioquímica y pueden adaptar la liberación de los g- α en la coagulación, inflamación, aterosclerosis, defensa antimicrobiana del hospedero, angiogénesis, reparación de heridas o malignidad.^{4,6-7,15}

Sistema canalicular abierto (SCA)

El SCA conectado con la superficie, comprende un elaborado sistema de endomembranas contiguas a la membrana plasmática con hendiduras y conductos que hacen túneles por todo el interior de las plaquetas. Si bien su papel en las plaquetas sigue siendo algo controvertido, se cree que el SCA cumple en gran medida tres funciones principales:

- La primera, es como mecanismo de entrada de elementos externos a las plaquetas, así como una potencial ruta para la liberación del contenido de los gránulos al exterior de las mismas. De hecho, en la activación plaquetaria, las subpoblaciones seleccionadas de g- α se trasladarán al centro de las plaquetas o se localizarán en la periferia de las mismas; denotando un posible mecanismo para la liberación diferencial de los gránulos.
- En segundo lugar, el SCA puede constituir un extenso reservorio de endomembranas que puede facilitar la formación y propagación de filopodios (espículas), tras la adhesión de las plaquetas a una superficie activadora. Este proceso da como resultado un aumento dramático en el área de superficie de la membrana plasmática en comparación con la plaqueta en reposo, y puede ser asistido por una fusión del contenido de los g- α y de los g-d hacia la membrana plasmática, tras la liberación de los mismos.
- Por último, el SCA puede funcionar como un sitio de almacenamiento de glicoproteínas de la membrana plasmática. Por ejemplo, la GPIb-IX-V, puede ser secuestrada selectivamente en el SCA tras la activación plaquetaria por la trombina (y posiblemente por la plasmina). Por el contrario, las proteínas de membrana del SCA pueden agruparse en la superficie de las plaquetas activadas, aunque el SCA contribuya mucho más con la fusión de los gránulos con la membrana plasmática.^{4,6-7,15}

Sistema tubular denso (STD)

Caracterizado por primera vez por histoquímica por la presencia de actividad peroxidasa, el STD es una red de canales cerrados de retículo endoplasmático residual que secuestra calcio ionizado (Ca^{2+}) similar a los sarcotúbulos del músculo esquelético. La calreticulina, proteína fijadora de Ca, probablemente sea responsable del cúmulo de Ca en el STD, que está regulado por una serie de moléculas mensajeras producidas durante la activación plaquetaria.

Por ejemplo, en la activación plaquetaria por la trombina, da como resultado la fosforilación de la subunidad $G_s\alpha$ de la proteína G, receptor acoplado a proteínas PAR-1 (del inglés, *protease-activated receptors 1*), que es responsable de activar la membrana asociada con enzimas generadoras de señales fosfolipasa C y fosfolipasa A2. La fosfolipasa C, a su vez, genera el segundo mensajero inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3), que se une a los receptores tipo II del IP3 en la membrana del STD para estimular la liberación de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} intracelular desde el STD acarrea la redistribución de la GPIIb-IIIa, la reorganización del citoesqueleto y la liberación de los gránulos; esto hace que la regulación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} en el STD sea un objetivo útil para la acción de medicamentos antiplaquetarios.^{4,6-7,15}

El citoesqueleto de las plaquetas en reposo

La forma de disco biconvexo de las plaquetas en reposo se mantiene mediante una estructura citoesquelética bien definida y altamente especializada. Este intrincado sistema de “puntales” y “vigas” moleculares preserva la forma y la integridad de las plaquetas al estar expuestas a altas fuerzas en el torrente sanguíneo. Los tres componentes principales del citoesqueleto plaquetario en reposo son: 1) el esqueleto de membrana basado en espectrina; 2) el citoesqueleto de microfilamentos finos de actina; y 3) el embobinado de microtúbulos marginales o periféricos.^{4,6-7,15}

Citoesqueleto asociado con la membrana plasmática basado en espectrina

La membrana plasmática y el SCA de las plaquetas en reposo están sostenidos por una compleja red citoesquelética. Las plaquetas son el único tipo de elemento forme sanguíneo además de los eritrocitos, cuyo citoesqueleto de membrana ha sido visualizado con alta resolución (microscopía electrónica). Al igual que los glóbulos rojos, el citoesqueleto asociado con la membrana plaquetaria también está autoensamblado de forma alargada en hebras de espectrina que se interconectan a través de la unión de microfilamentos de actina, generando poros con una forma triangular. Las plaquetas contienen aproximadamente 2.000 moléculas de espectrina. Esta lámina formada por una red de espectrina se ubica en la superficie citoplasmática del SCA y del plasmalema (cara P).

Aunque se entiende mucho menos sobre cómo la red de espectrina-actina se ensambla y se une a la membrana plasmática en relación con los glóbulos rojos, se han descrito ciertas diferencias entre los dos citoesqueletos (el de las plaquetas y el de los eritrocitos). Primero, las hebras de espectrina que componen el citoesqueleto de la membrana plaquetaria se interconectan utilizando los extremos de largos filamentos de actina en lugar de oligómeros de actina cortos. Estos extremos aparecen vinculados físicamente con la membrana plasmática provenientes de microfilamentos de actina citoplasmáticos. Por lo tanto, la red de espectrina se ensambla en una red continua por su asociación con los microfilamentos de actina. En segundo lugar, las tropomodulinas no están presentes en niveles suficientemente altos como para tener un papel importante en el recubrimiento de los extremos puntiagudos de los filamentos de actina; en cambio, se ha demostrado que un número significativo (alrededor de 2.000) de estos extremos se encuentran libres en las plaquetas en reposo. En tercer lugar, la aducina se expresa de manera abundante y aparece para encapsular la mayoría de los extremos con forma de púas de los filamentos de actina en el citoesqueleto plaquetario en reposo. La aducina es un componente clave del citoesqueleto anclado en la membrana plasmática plaquetaria, formando una tríada con actina filamentosa (actina-F) y espectrina y un recubrimiento de los extremos de filamentos en forma puntiaguda con aducina. Se ha descrito también, mayor afinidad de los complejos aducina-espectrina dirigidos hacia la membrana plasmática, que cualquiera de otros complejos aductores y que la actina sola.

La activación de receptores celulares por estímulos fisiológicos o exógenos produce cambios dramáticos en la forma y función celulares, tales cambios dependen principalmente de la reestructuración de la malla de actina. Dentro de las proteínas entrecruzadoras de actina-F como la espectrina, la fimbrina o la α -actinina, la filamina A (FLNa) es la más eficiente en formar geles ortogonales tridimensionales de actina.^{4,6-7,15}

El citoesqueleto con participación de la actina

El citoesqueleto plaquetario contiene dos componentes basados en filamentos de actina. Uno son los filamentos de actina citoplasmáticos que ocupan el citoplasma y median los eventos contráctiles. El otro es el citoesqueleto asociado con la membrana plasmática, que recubre el plasmalema en su cara citosólica (cara P) y regula propiedades de la membrana como sus contornos y estabilidad.

En las plaquetas no estimuladas, sólo el 30-40% de la actina se polimeriza en filamentos (actina-F); se cree que el resto de la actina polimerice mediante la asociación de timosina- β 4 con actina monomérica o globular (actina-G) y por la asociación de gelsolina con los extremos en forma de púas de filamentos de actina preexistentes. Cuando se activan las plaquetas, hay un rápido aumento en la polimerización de actina-G, nuevos filamentos forman el eje de los filopodios o espículas extendidas y forman una red en la periferia de la plaqueta. Como resultado de la activación, los microfilamentos gruesos de miosina se unen con los microfilamentos finos de actina citoplasmáticos, promoviendo que se muevan hacia el centro de las plaquetas. A medida que las plaquetas se agregan, se producen reorganizaciones citoesqueléticas adicionales: la GPIIb-IIIa se asocia con un ligando adhesivo en un agregado plaquetario, esto da como resultado la asociación de GPIIb-IIIa, proteínas del citoesqueleto de membrana y moléculas de señalización con actina citoplasmática. El citoesqueleto juega un papel crítico en la regulación de los eventos de transducción de señales en las plaquetas.

La actina, en una concentración de 0,5 mM, es la más abundante de todas las proteínas plaquetarias con más de dos millones de moléculas por plaqueta. De manera distinta ocurre con la tubulina. La actina se encuentra en un equilibrio dinámico monómero-polímero (actina-G/actina-F). Un poco menos de la mitad de las subunidades de actina se ensamblan para formar entre 2.000 y 5.000 filamentos lineales presentes en las plaquetas en reposo. El resto de la actina en el citoplasma se mantiene almacenado como un complejo 1:1 con timosina- β 4 y se convierte en filamentos durante la activación plaquetaria para impulsar los cambios estructurales celulares.

La evidencia indica que los filamentos de las plaquetas en reposo están entrecruzados en varios puntos en una red citoplásmica rígida, ya que las plaquetas expresan niveles altos de concentraciones proteicas reticulares de actina, incluidas las filaminas (FLN) y α -actinina. Tanto las FLN como la α -actinina son homodímeros en solución. Las subunidades de FLN son hebras alargadas compuestas principalmente de 24 repeticiones, cada una con aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, que se pliegan en una estructura con forma de β -barriles, similares a la inmunoglobulina G (IgG).

Hay tres genes que codifican para la síntesis de FLN, ubicados en los cromosomas 3, 7 y X. La FLNa (en el cromosoma X) y la FLNb (en el cromosoma 3). La FLNa se expresa en las plaquetas más de diez veces en relación con la FLNb. Se reconoce que las FLN forman una proteína de andamiaje prototípica que atrae proteínas de unión asociadas con los microfilamentos de actina y las posiciona adyacentes a la membrana plasmática plaquetaria. Proteínas unidas a las FLN incluyen miembros proteicos de las pequeñas GTPasas (Rho, Rac, ralA y Cdc42) con unión de ralA de manera dependiente de trifosfato de guanosina (en español TFG, en inglés GTP); los factores cambiarios Trio y Toll,⁸ cinasas tales como PAK1 (del inglés, *p21-activated kinase 1*), fosfatasa, y proteínas transmembrana. La conexión entre las FLN y la cola citoplasmática de la subunidad GPIb α del complejo GPIb-IX-V es muy importante para la organización estructural de las plaquetas en reposo. Experimentos bioquímicos demostraron que la mayoría de las FLN (>90%) en las plaquetas se disponen en un complejo con la GPIb α .

Esta interacción tiene tres consecuencias: 1) coloca el dominio de autoasociación de las FLN y sus correspondientes proteínas asociadas en la membrana plasmática al mismo tiempo que exponen FLN en sitios de unión de actina al citoplasma; 2) dado que una gran fracción de las FLN está unida a la actina, organiza los complejos de la GPIb-IX-V en filas lineales en la superficie de las plaquetas sobre los filamentos subyacentes; y 3) porque entre los enlaces de las FLN, los filamentos de actina y el complejo GPIb-IX-V pasan a través de poros de la red de espectrina, restringiendo el movimiento molecular de la espectrina como hilos en una malla y mantiene la compresión de la estructura. La conexión del complejo FLN-GPIb α es crítica para la formación y liberación de plaquetas discoides por los megacariocitos.

Las plaquetas que carecen de esta conexión son frágiles y grandes y se producen en bajas cantidades. Sin embargo, el papel de la conexión FLN-receptor del factor von Willebrand (FLN-vWFr) en la estructuración plaquetaria *per se*, no ha sido comprendida completamente.^{4,6-7,15}

Citoesqueleto: la banda marginal de microtúbulos

Una de las características más distintivas de las plaquetas en reposo es su bobina marginal de microtúbulos. Los dímeros de tubulina alfa-beta se polimerizan en microtúbulos en condiciones fisiológicas y en las plaquetas en reposo, la tubulina igualmente se separa entre fracciones de dímero y polímero.

Las subunidades de tubulina α y β de los microtúbulos están en un equilibrio dinámico, de modo que se observan los ciclos reversibles de ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos. Los microtúbulos son elementos del citoesqueleto constituidos por polímeros de tubulinas, largos, de 24 nm de diámetro, responsables de muchos tipos de movimientos celulares, como el transporte de organelas, vesículas y gránulos dentro de la partícula y la segregación de cromosomas durante la mitosis (huso mitótico), en las células que sufren el proceso de división celular, no en las plaquetas.

La bobina de microtúbulos de las plaquetas en reposo, ha sido descrita como un solo microtúbulo de aproximadamente 100 μm de largo, enrollado de 8 a 12 veces en la periferia plaquetaria. La función de la bobina de microtúbulos es mantener la forma discoide de las plaquetas en reposo.

El desensamblaje de los microtúbulos plaquetarios con fármacos como nocodazole, colchicina o la vincristina hace que las plaquetas se redondeen y pierdan su forma discoide.¹⁰⁻¹²

Enfriar las plaquetas a 4 $^{\circ}\text{C}$ también ocasiona la despolimerización de la espiral de microtúbulos y pérdida de la forma del disco.¹⁰

A propósito de la refrigeración plaquetaria, y aun cuando no se relaciona directamente con los microtúbulos plaquetarios, es importante señalar que la refrigeración de los CP, media un efecto bivalente sobre la coagulación plasmática. A temperatura ambiente, la reducción parcial de los factores de coagulación lábiles es menor. Almacenados en refrigeración, no previene el agotamiento del factor VIII, pero induce una pérdida adicional de la actividad del Factor von Willebrand (vWF) por escisión del multímero. La generación de trombina se conserva en frío y puede indicar una mayor capacidad hemostática de los CP almacenados en frío.¹² Sin embargo, se ha reportado que CP obtenidos con el sistema Reveos™,¹⁴ pueden almacenarse en frío (4-6 $^{\circ}\text{C}$) desde el día 1 hasta el día 21, y cuando se almacenan de manera retrasada, pueden permanecer en almacenamiento refrigerado, desde el día 5 hasta el día 14.¹⁵ También se ha discutido si la aplicación de nuevas tecnologías para el estudio mitocondrial y la función glicolítica en los CP podría proporcionar una mejor comprensión del metabolismo plaquetario durante el almacenamiento de los CP a temperatura ambiente y bajo refrigeración.¹⁷ La refrigeración de los CP puede proporcionar ventajas debido a menores riesgos de crecimiento bacteriano y mayor capacidad de respuesta de las plaquetas.

En estudios transgénicos se ha mostrado que en modelos murinos que carecen de la principal isoforma de la tubulina β específica en la hematopoyesis (tubulina $\beta 1$) tienen plaquetas que carecen de la forma característica de disco y contienen espirales marginales defectuosas. La eliminación genética de la tubulina $\beta 1$ en ratones produce trombocitopenia con ratones que tenían cuentas plaquetarias circulantes inferiores al 50% de lo normal. Las plaquetas deficientes de tubulina $\beta 1$ tienen forma esférica y esto parece deberse a bandas marginales defectuosas con espirales reducidas de microtúbulos, mientras que las plaquetas en reposo en condiciones fisiológicas poseen una banda marginal que consta de 8 a 12 espirales, las plaquetas *knockout* de tubulina $\beta 1$ contienen sólo 2 a 3 espirales.

La sustitución del par de bases de tubulina $\beta 1$ (AG \rightarrow CC) en el humano, producto de la mutación Q43P,¹⁸ ha sido identificada y demostrada que causa alteraciones plaquetarias cuantitativas,

funcionales y estructurales. La variante de tubulina β 1Q43P se encontró en 10,6% de la población general y en el 24,2% de 33 pacientes no relacionados con macrotrombocitopenia congénita no definida.¹⁹⁻²⁰

Sin embargo, en estudios ultraestructurales revelaron plaquetas esféricas grandes con una espiral de microtúbulos rota y alteraciones estructurales. Curiosamente las personas con plaquetas poseedoras de la variante de tubulina β 1Q43P, mostraron trombocitopenia leve, plaquetas disfuncionales y con liberación reducida de ATP, agregación inducida por el péptido activador del receptor de trombina (TRAP) e inhibición de la adhesión al colágeno.^{19,21} Se registró una prevalencia de más del doble de la variante tubulina β 1 observado en sujetos sanos que no sufrieron eventos isquémicos, lo que indica que podría conferir una ventaja evolutiva y un papel protector cardiovascular.²²

Los microtúbulos que forman la espiral periférica en las plaquetas poseen proteínas asociadas con los microtúbulos (del inglés, *Microtubule Associated Proteins*, MAPs) que modulan la estabilidad del polímero (MAPs estructurales), y MAPs motrices como la cinesina y la dineína citoplasmáticas. Las funciones de las MAPs motrices en las plaquetas en reposo, aún no son bien conocidas.^{4,6-7,15}

Gránulos plaquetarios

Gránulos alfa (g- α)

Una de las características más interesantes de las plaquetas es la gran cantidad de moléculas biológicamente activas que se almacenan en sus gránulos. Estas moléculas son sintetizadas y están destinadas para ser administradas con precisión en los sitios de lesión vascular y funcionar para reclutar otros elementos formes sanguíneos.

En las plaquetas en reposo, los gránulos se ubican en la proximidad de la membrana del SCA. Durante la activación, los gránulos se fusionan y secretan al SCA. Las plaquetas tienen dos gránulos de almacenamiento principales: g- α y g-d. Los más abundantes son los g- α (alrededor de 50 a 80 por plaqueta), que contienen proteínas esenciales para la adhesión plaquetaria durante la reparación vascular, por ejemplo GPIIb-IIIa, fibrinógeno (Fb), vWF.

Estos gránulos suelen tener entre 200 y 500 nm de diámetro y poseen formas esféricas con un core central electrondenso. Se originan a partir de la cara trans de los dictiosomas del complejo de Golgi, donde ya en los gránulos en ciernes se observa su característico core o nucleoide electrondenso.

Los g- α obtienen su contenido molecular tanto por la síntesis de proteínas endógenas, como por la absorción y empaquetamiento de proteínas exógenas provenientes de la membrana plasmática mediante endocitosis y pinocitosis mediada por receptores. De manera endógena, se detectan en los megacariocitos proteínas sintetizadas como la β -tromboglobulina, el factor plaquetario 4 (FP4) y el vWF antes que las proteínas endocitadas como el Fb. Además, en el complejo de Golgi predominan las proteínas sintetizadas, mientras que las proteínas endocitadas se encuentran en las regiones periféricas de la plaqueta.

Se ha establecido que la captación y entrega de Fb a los g- α es mediada por la glicoproteína principal de membrana IIb-IIIa. Las proteínas de membrana esenciales para la función plaquetaria también están empaquetadas en los g- α , incluidas GPIIb-IIIa, P-selectina (CD62P) y CD36. Los g- α también tienen la mayor parte de P-selectina celular en su membrana. Una vez insertada en la membrana plasmática, la P-selectina recluta granulocitos neutrófilos a través del contrarreceptor de neutrófilos, el ligando de la glicoproteína P-selectina (del inglés, *P-selectin glycoprotein ligand 1*, PSGL1).

Los g- α también contienen más de 30 proteínas reguladoras de la angiogénesis, que les permiten funcionar como reguladores móviles del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Un

conjunto de datos experimentales sugiere que algunas clases de proteínas pueden empaquetarse diferencialmente en los gránulos plaquetarios, proporcionando un mecanismo para la liberación diferencial de proteínas, aunque aún se sabe poco sobre el tránsito intracelular de las proteínas en los megacariocitos y en las plaquetas. Experimentos con microscopía que utilizan criofructura ultrafina y la microscopía inmunoeléctrica sugieren que los cuerpos multivesiculares (CMV), que son estructuras intermediarias en la formación de los g- α , son esenciales en la etapa de ensamblaje de los g- α .

Durante el desarrollo de los megacariocitos, estos CMV grandes (hasta 0,5 μ m) que contienen vesículas internas de 30 a 70 nm experimentan una transición hacia g- α que contienen material predominantemente electrondenso. Estudios que examinan la internalización cinética de partículas exógenas de Fb y albúmina sérica bovina marcada con partículas de oro coloidal, evidencian que los CMV y los g- α se alinean secuencialmente en la vía endocítica. Los CMV contienen proteínas que se secretarán en la etapa de activación plaquetaria como la β -tromboglobulina, el vWF y la P-selectina y la proteína de membrana lisosomal CD63, lo que sugiere que son organelas precursoras de los g- α .^{4,6-7,15}

Un resumen del contenido de los g- α , lo podemos observar en la Tabla N° 1.^{23,25}

Tabla N° 1. Contenido de los g- α :

Tipo	Ejemplos
Proteínas integrales de membrana	α IIb β 3, GPIb-IX-V, GPVI, P-selectina
Proteínas coagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas	Factores V, IX, XIII, antitrombina, proteína S, inhibidor de la vía del factor tisular, plasminógeno, α 2-macroglobulina
Proteínas de adhesión	Fibrinógeno, factor von Willebrand, trombospondina
Quimiocinas	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (FP4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES)
Factores de crecimiento	Factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento del hepatocito, factor de crecimiento similar a la insulina, factor β transformador del crecimiento
Factores e inhibidores angiogénicos	Factor de crecimiento del endotelio, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, angiostatina, endostatina
Proteínas bactericidas	Timosina- β 4, trombocidinas 1 y 2
Mediadores inmunes	Precursor de la fracción 3 del complemento (C3), precursor de la fracción 4 del complemento (C4), IgG

Leyenda: CCL, ligando de quimiocina (motivo C-C); CXCL, ligando de quimiocina (motivo C-X-C); ENA-78, péptido 78 activador de neutrófilos derivado de epitelio; GP, glicoproteína; GRO- α , oncogén α regulador del crecimiento; IgG, inmunoglobulina G; IL8, interleucina 8; MCP-1, proteína 1 quimiotáctica de monocitos; MIP-1 α , proteína 1 α inflamatoria de macrófagos; FP4, factor plaquetario 4; RANTES, regulador por activación de linfocitos T normales expresados y secretados.

Gránulos densos (g-d)

Los g-d (o cuerpos densos) tienen un tamaño de 150 nm y se identifican en micrografías electrónicas por un nucleóide electrondenso, y funcionan predominantemente para reclutar plaquetas adicionales a los sitios de daño vascular. Los g-d albergan una variedad de moléculas activas desde el punto de vista hemostático que se secretan tras la activación plaquetaria, incluyendo catecolaminas, serotonina, Ca,

5'-difosfato de adenosina o ADP y 5'-trifosfato de adenosina o ATP. El ADP es un agonista plaquetario que desencadena cambios de la forma plaquetaria, liberación de gránulos y agregación. El transporte de serotonina en los g-d es esencial para el proceso de regeneración hepática. La inmunoelectromicroscopía ha indicado que los CMV son una etapa esencial en la maduración de los g-d y constituyen un compartimento intermedio entre los g-α y los g-d.^{4,6-7,15,25}

Un resumen del contenido de los g-d, lo podemos observar en la Tabla N° 2.²³⁻²⁴

Tabla N° 2. Contenido de los g-d:

Tipo	Ejemplos
Cationes	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺
Fosfatos	Polifosfato, pirofosfato
Aminas bioactivas	Serotonina, histamina
Nucleótidos	ADP, ATP, UTP, GTP

Legenda: ADP, Difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; GTP, trifosfato de guanosina; UTP, trifosfato de uridina.

Organelas plaquetarias

Las plaquetas contienen una cantidad relativamente pequeña de mitocondrias, que se reconocen con el microscopio electrónico por sus cisternas aplanadas, las mitocondrias proporcionan la fuente de energía para que en los seres humanos, las plaquetas circulen durante 8 a 10 días. Los lisosomas y peroxisomas también están presentes en el citoplasma de las plaquetas. Los lisosomas también son pequeñas organelas que contienen una gran variedad de sustancias degradativas, enzimas que incluyen catepsina, β-galactosidasa, arilsulfatasa, β-glucuronidasa y fosfatasa ácida. Los lisosomas funcionan principalmente en la degradación del material internalizado por fagocitosis o pinocitosis. Los peroxisomas son pequeños orgánulos que contienen la enzima catalasa.^{4,6-7,15}

Un resumen del contenido de los lisosomas, lo podemos observar en la Tabla N° 3:²³⁻²⁴

Tabla N° 3. Contenido de los lisosomas plaquetarios:

Tipo	Ejemplos
Enzimas que degradan proteínas	Catepsinas, elastasa, colagenasa, carboxipeptidasa
Enzimas que degradan carbohidratos	Glicosidasa, galactosidasa, manosiadasa
Enzimas que rompen ésteres fosfato	Fosfatasa ácida

Un resumen de las características generales de los gránulos plaquetarios lo podemos observar en la Tabla N° 4:²³⁻²⁴

Tabla N° 4. Características generales de los gránulos plaquetarios:

Tipo de gránulo	Nº/ plaqueta	Diámetro (nm)	Área de superficie (µm ²)/plaqueta	Marcadores comunes	Función general
Gránulos α (g-α)	50 – 80	200 – 500	14	vWF CXCL4 (FP4) P-selectina	<ul style="list-style-type: none"> – Hemostasia/trombosis – Inflamación – Angiogénesis – Defensa del huésped

					– Mitogénesis
Gránulos densos (g-d)	3 – 8	150	<1	CD63 Serotonina	– Hemostasia/trombosis – Inflamación
Lisosomas	<3	200 – 250	<1	Fosfatasa ácida	– Digestión endosómica

Leyenda: vWF, factor von Willebrand; CXCL4, citocina perteneciente a la familia de quimiocinas con motivo C-X-C o FP4, factor plaquetario 4; CD63, miembro de la superfamilia de las tetraspaninas para la activación ligada a antígenos de superficie.

Mutaciones en los factores de transcripción como el factor GATA1 (los factores de transcripción GATA son una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unirse a la secuencia de ADN, donde G es Guanina, A es Adenina y T es Timina), factor independiente del crecimiento 1b (del inglés, *Growth factor independent 1B*, *Gfi1b*) y el factor de transcripción 1 relacionado con Runt (del inglés, *Runt-related transcription factor 1*, *RUNX1*), causan enfermedades familiares. Las plaquetas con alguna de esas mutaciones, exhiben anomalías comunes que incluyen reducción de los g- α que ocasiona una apariencia grisácea en los frotis sanguíneos (síndrome de plaquetas grises). Circunstancias en las que algunas vías de señalización intracelular se encuentran desreguladas debido a mutaciones en factores de transcripción nuclear, hace necesario el estudio de la proteómica plaquetaria mediante tecnologías como la espectrometría de masa cuantitativa, con la que se han detectado cerca de 2.875 proteínas plaquetarias. Existen proteínas mutadas relacionadas significativamente con la disminución de la función plaquetaria, la hemostasia y la biología de los gránulos, en consonancia con la disfunción plaquetaria y el riesgo de eventos hemorrágicos.²⁶

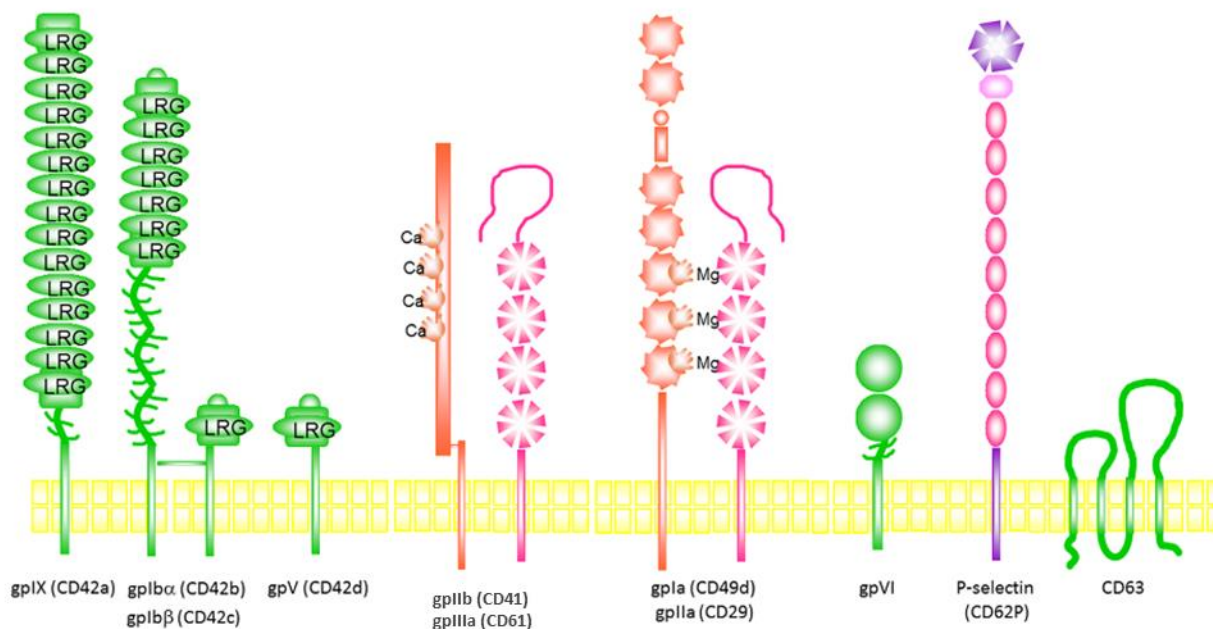
Inmunotipificación plaquetaria por citometría de flujo

Los trastornos hereditarios de la función plaquetaria son enfermedades hemorrágicas raras. El estándar de oro para su exploración es la agregación óptica; sin embargo, las investigaciones por citometría de flujo (CMF) se utilizan cada vez más para exploraciones cualitativas y cuantitativas. Esto requiere preparación (entrenamiento técnico) y precauciones y entornos analíticos específicos, especialmente en la tipificación de la membrana plaquetaria con anticuerpos dirigidos al CD42a o al CD41, respectivamente, útiles para evaluar los defectos genéticos.

El inmunofenotipaje por CMF es fundamental para el estudio diagnóstico de la trombocitopenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier. De igual manera, para los trastornos de la degranulación plaquetaria, especialmente explorados tras la activación plaquetaria, midiendo la expresión en la superficie de la P-selectina (CD62P) o CD63. La captación y liberación de mepacrina después de la activación es otra prueba que permite explorar la función de los g-d. Alteraciones en el movimiento de ciertos fosfolípidos (*flip-flop*), es característico de una anomalía relacionada con el síndrome de Scott.

En la Figura N° 1 se representa un esquema con los principales antígenos de diferenciación plaquetaria, que pueden ser determinados por CMF:

Figura N° 1. Principales antígenos de diferenciación plaquetaria:²⁷⁻²⁸



Leyenda: de izquierda a derecha; GPIIX (CD42a); GPIIbα (CD42b); GPIIbβ (CD42c); GPV (CD42d), con repeticiones de glicoproteína rica en leucina (LRG) y regiones de mucina; GPIIb (CD41); GPIIIa (CD61), una integrina; GPIa (CD49d); GPIIa (CD29), otra integrina también conocida como VLA4 (antígeno muy tardío); GPVI, de la superfamilia de las inmunoglobulinas con una región de mucina; P-selectina (CD62P), una C-lectina; CD63, una tetraspanina.

Fisiología plaquetaria

Secreción de los gránulos

Mecanismos de secreción de los gránulos plaquetarios

La fusión de membranas juega un papel clave en la secreción de los gránulos plaquetarios. Después de la activación plaquetaria, los gránulos se acumulan en el centro de la partícula durante el cambio de forma de las plaquetas y puede fusionarse uno con otro de manera homotípica. En un paso adicional, los gránulos se fusionan con el SCA liberando su contenido en sus canales y por lo tanto, finalmente al espacio extracelular.

Otro mecanismo de liberación de los gránulos es la fusión directa con la membrana plasmática. Receptores solubles a factores sensibles de N-etilmaleimida [del inglés, *SNARE*, *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) and the soluble NSF attachment proteins SNAPs*] en los gránulos, a saber, SNARE vesiculares (del inglés, *vSNARE*) y los llamados SNARE objetivo (del inglés, *tSNARE*), asociados con la membrana plasmática y al SCA, median la fusión de los gránulos entre sí, con el SCA y con el plasmalema. Las proteínas más importantes para la liberación de los gránulos, asociadas con vesículas (del inglés, *Vesicle Associated Membrane Protein, VAMP*) son la VAMP-8 y la vSNARE, mientras que VAMP-2 y 3 pueden desempeñar papeles menores.

Las sintaxinas 2, 4, 7, 11 y 12 y la SNAP-23, -25 y -29 han sido descritas como tSNAREs. La función de las SNARE en la secreción de los gránulos está regulada por proteínas chaperonas como la ATPasa del factor sensible a la etilenmaleimida (del inglés, *NSF*) dependiente de Mg^{2+} . NSF desensambla la membrana asociada con complejos SNARE permitiendo así su interacción con moléculas afines en membranas opuestas. Los péptidos inhibidores y los anticuerpos contra el NSF alteran la liberación de g-α.

Otras proteínas importantes en el proceso de liberación del contenido de los gránulos plaquetarios (y también en la de neurotransmisores desde las vesículas sinápticas), son las Sec1/Munc (del inglés, *syntaxin-binding protein 1/mammalian uncoordinated*) y las Rab (la familia de proteínas Rab son miembros de la superfamilia Ras, de proteínas G pequeñas), que pueden influir en la función de los SNARE. La composición lipídica de la membrana granular también afecta su capacidad de fusionarse con el plasmalema. El citoesqueleto plaquetario participa en la secreción granular, aunque la polimerización de actina parece inhibir la liberación de los gránulos en las plaquetas en reposo, facilita su secreción durante la activación plaquetaria. La interacción de la actina y la miosina durante la contracción plaquetaria puede promover la liberación del contenido de los gránulos. La participación de los microtúbulos también es importante a través de la movilización de los gránulos, gracias a las MAPs motrices. Al igual que en otras células, el aumento de la disposición de Ca^{2+} intracelular promueve la secreción de los gránulos. Finalmente, varias isoformas de proteína cinasa C participan en la liberación granular plaquetaria, en particular, las isoformas α y β de la proteína cinasa C.²⁴

Funciones de la secreción de los gránulos plaquetarios

La secreción de gránulos participa en los siguientes procesos: hemostasia y trombosis, inflamación, aterogénesis, función bactericida y mitogénesis.

Tras la activación plaquetaria, los $g\text{-}\alpha$ liberan Fb y vWF, que promueven interacciones interplaquetarias, y entre las plaquetas y las células endoteliales. La proteína $\alpha IIb\beta 3$, receptor del Fb; la GPVI, receptor de colágeno y la GPIb-IX-V, componentes del complejo receptor del vWF, que se encuentran en los $g\text{-}\alpha$ se expresan en la superficie de las plaquetas y posteriormente apoyan la adhesión plaquetaria.

Al liberar factores de la coagulación como los factores V y IX, los $g\text{-}\alpha$ también participan en la hemostasia secundaria. Finalmente, los $g\text{-}\alpha$ pueden estar implicados en el mantenimiento del equilibrio hemostático secretando proteínas que limitan la coagulación, incluidas la antitrombina, proteína S y el inhibidor de la vía del factor tisular. La contribución de los $g\text{-}\alpha$ en la hemostasia normal es evidenciada por la tendencia al sangrado en pacientes con síndrome de plaquetas grises. Según su contenido, podría esperarse la participación de los $g\text{-}\alpha$ en eventos trombóticos.

Los $g\text{-}d$ participan en la hemostasia y la trombosis como fuente principal de ADP, que actúa como un fuerte agonista plaquetario en los sitios de lesión vascular. Adicionalmente, la secreción de la serotonina favorece la agregación plaquetaria y promueve el aumento del tono vascular. Mientras se libera Ca^{2+} , los polifosfatos contribuyen a la formación de coágulos. Por el contrario, algunos de los polifosfatos de diadenosina liberados, son antagonistas parciales de los receptores de ADP y pueden estar involucrados en la limitación de la activación plaquetaria una vez que ha comenzado. Se ejemplifica la importancia de los $g\text{-}d$ en la hemostasia normal, en la diátesis hemorrágica en pacientes con síndrome de Hermansky, síndrome de Pudlak o síndrome de Chediak-Higashi, mientras que se ha demostrado su participación en la formación de trombos mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Tanto los $g\text{-}\alpha$ como los $g\text{-}d$ participan en procesos inflamatorios. Los $g\text{-}\alpha$ proporcionan suficientes receptores plaquetarios que permiten la interacción con leucocitos y células endoteliales, lo que conduce a una activación mutua, reclutamiento celular y propagación del fenotipo en los procesos inflamatorios. Los $g\text{-}\alpha$ liberan numerosos factores proinflamatorios e inmunomoduladores que promueven el reclutamiento y activación de células inflamatorias, secreción de quimiocinas, así como la diferenciación celular.

El papel de los $g\text{-}\alpha$ en la aterosclerosis se debe principalmente a sus acciones proinflamatorias. Los $g\text{-}d$ pueden secretar polifosfatos y, por tanto, iniciar la generación de bradicinina que apoya la permeabilidad vascular y el edema *in vivo*. En modelos murinos con deficiencia de $g\text{-}d$, se ha

demostrado la participación de estos en la aterogénesis. Los g- α participan en la defensa del hospedero proporcionando varias proteínas antimicrobianas, por ejemplo, quimiocinas (motivo C-X-C) ligando 4 (CXCL4), derivados de CXCL7, CCL5 (RANTES, del inglés, *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), y timosina- β 4, así como complemento y proteínas de unión al complemento. En los g- α se han identificado la disponibilidad de proteínas proangiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico y el factor similar a la insulina, así como inhibidores de la angiogénesis, incluida la trombospondina-1, CXCL4, angiostatina y endostatina. Estudios recientes sugieren que los factores se liberan específicamente como agonistas conllevando efectos pro y antiangiogénicos. La secreción de los g- α puede desempeñar un papel en el crecimiento y estabilidad tumoral, la formación de metástasis, y la cicatrización de heridas.²⁴

Glicoproteínas (GP) de la superficie plaquetaria

Aunque existen muchos tipos de proteínas en la superficie plaquetaria, los complejos GPIb-IX-V, GPVI y la integrina α IIb β 3 (también conocida como GPIIb/IIIa) se consideran los más importantes. Estas proteínas conjugadas con carbohidratos (proteínas complejas) intervienen en la adhesión, activación y agregación de las plaquetas, respectivamente.

Complejo GPIb-IX. Actúa como receptor de superficie y está muy involucrado en la hemostasia normal, así como en eventos trombóticos arteriales. Desde el punto de vista estructural, la GPIb α humana es una GP integral transmembranal a un solo paso con un grupo amino (N)-terminal, un dominio de unión al ligando, un núcleo de sialomucina, un dominio transmembrana y un extremo carboxi (C)-citoplasmático. El dominio de unión al ligando comprende siete repeticiones en tándem ricas en leucina, una secuencia cubriendo el N-terminal, una secuencia flanqueante C-terminal y una secuencia aniónica. La GPIb α y la GPIX están presentes en aproximadamente 25.000 copias por plaqueta, mientras que la GPV está presente en aproximadamente 12.500 copias.

La función de la GPIb-IX-V propaga la adhesión de las plaquetas activadas hacia las células endoteliales y estructuras subendoteliales del vaso sanguíneo lesionado, uniéndose principalmente su ligando más importante, el vWF, que a su vez es capaz de unirse al colágeno subendotelial. Otro ligando para la GPIb-IX-V es la trombospondina, que parece mediar la adhesión plaquetaria a altas velocidades de cizallamiento en ausencia del vWF. Se ha demostrado que GPIb α también puede unirse a la P-selectina, ofreciendo así otro mecanismo de interacción entre las propias plaquetas y las plaquetas con las células endoteliales. Así mismo, la integrina α M β 2 (Mac-1) [subfamilia de integrinas β 2, entre los miembros de la familia β 2, la integrina Mac-1 (α M β 2, CD11b/CD18)] sirve como contrarreceptor para la GPIb-IX-V, que permite la unión de las plaquetas a los leucocitos. Adicionalmente a su papel en la adhesión plaquetaria, la GPIb-IX-V ensambla sitios de unión para la α -trombina, Factor XI y quininógeno de alto peso molecular, favoreciendo la actividad procoagulante de las plaquetas activadas. Por el contrario, la unión del Factor XII a la GPIb α compete con la unión del quininógeno e inhibe la agregación plaquetaria dependiente de trombina.

Finalmente, los complejos procesos de señalización se inician mediante la polimerización reticular de la GPIb-IX-V por el vWF u otros ligandos multivalentes, fomentando la activación de la α IIb β 3 y el desprendimiento del ectodominio de la GPIb α .²³⁻²⁴

Glicoproteína VI. La GPVI es el principal receptor de señalización del colágeno en las plaquetas humanas y ejerce funciones en la hemostasia y otros procesos mediados por las plaquetas. Desde el

punto de vista estructural, la GPVI pertenece a la superfamilia de receptores de las inmunoglobulinas. Consta de 319 aminoácidos y está presente en aproximadamente 3.700 copias por plaqueta.

La GPVI comprende dos dominios de inmunoglobulina extracelular, D1 y D2, que son conectados por una cadena peptídica y unidos al dominio transmembrana a través de un tallo glicosilado. El dominio citoplasmático de la GPVI humana consta de 51 aminoácidos y muestra un área rica en aminoácidos cerca de la región transmembrana y un área rica en prolina. La GPVI existe formando un complejo con la cadena FcR (receptor de la fracción cristalizante de la inmunoglobulina), que se expresa en las plaquetas en formas monomérica y dimérica. La forma monomérica se encuentra particularmente presente en plaquetas inactivadas y su afinidad por el colágeno es muy baja para permitir la activación en respuesta a factores fisiológicos. Por el contrario, la forma dimérica tiene una mayor afinidad por el colágeno y la unión de colágeno al complejo dimérico puede resultar en señales intracelulares que conducen a la generación de más dímeros. Sin la cadena FcR, la GPVI no alcanza la superficie de las plaquetas y no se inicia la activación plaquetaria inducida por colágeno.

Desde el punto de vista funcional, las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno expuestas mediante el vWF y la GPIb-IX-VI en células inmobilizadas; esto permite la unión de baja afinidad del colágeno a la GPVI y da como resultado señales intracelulares con posterior activación de integrinas, de adentro hacia afuera, incluidas las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y la $\alpha \text{IIb}\beta 3$, así como una mayor agrupación de GPVI. De este modo, se refuerza la activación de GPVI y se estabilizan las plaquetas. La adhesión y la extensión se promueven mediante la unión de la integrina $\alpha 2\beta 1$ y la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ al colágeno y al vWF, respectivamente. Tras la activación por el colágeno y otros agonistas, la GPVI se elimina rápidamente de la superficie de las plaquetas, lo que probablemente previene el exceso de la estimulación de megacariocitos en la médula ósea y la activación plaquetaria, mediados por colágeno como consecuencia de daños en la integridad de la pared vascular.

Los defectos hereditarios de la GPVI se han reportado en pocos pacientes y se asociaron solo con un síndrome hemorrágico leve, lo que sugiere que la hemostasia puede no ser la función principal del complejo receptor GPVI. La GPVI también puede estar involucrada en fenómenos distintos a la hemostasia, por ejemplo, en la patogénesis de la artritis reumatoide y el desarrollo del sistema cardiovascular.²³⁻²⁴

Integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$. Es una integrina de la superficie plaquetaria (anteriormente denominada GPIIb-IIIa), se transforma desde su estado en reposo de baja afinidad a un receptor en estado de alta afinidad como el paso final de la activación plaquetaria y posteriormente media la agregación plaquetaria en el ámbito molecular.

Desde el punto de vista estructural la $\alpha \text{IIb}\beta 3$ pertenece a la familia de las integrinas que son moléculas de adhesión celular y se encuentra en las plaquetas, los megacariocitos, mastocitos, basófilos y algunas células tumorales. Con 80.000 a 100.000 copias por plaqueta, constituye la principal proteína integral de la membrana plasmática en las plaquetas humanas. Representa el 17% de las proteínas del plasmalema. La $\alpha \text{IIb}\beta 3$ está presente en la membrana de los g- α y puede expresarse después la activación plaquetaria. La $\alpha \text{IIb}\beta 3$ es un heterodímero que consta de las subunidades αIIb y $\beta 3$, ambas sintetizadas como cadenas de polipéptidos glicosilados únicos; la αIIb consta de 1.008 aminoácidos, mientras que la $\beta 3$ está compuesta por 762 aminoácidos. Ambas subunidades comprenden un gran dominio extracelular, un segmento transmembrana y una cola citoplasmática corta, y están dispuestos en la superficie de las plaquetas en una orientación tipo 1 (proteína transmembranal a un solo paso) con el extremo N que reside en la región extracelular y el extremo C dentro del citosol.

Desde el punto de vista funcional, la activación plaquetaria inducida por agonistas desencadena eventos de activación intracelular, de señalización que convergen en las colas citoplasmáticas de la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y luego se transmiten a través de la membrana a través de señales de adentro hacia afuera, lo que finalmente resulta en la transformación del dominio extracelular de la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ en un receptor de alta afinidad para el Fb y el vWF. Por la unión bivalente de Fb o vWF multivalente, la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activada permite interacciones interplaquetarias y en consecuencia, la formación de agregados plaquetarios. Además, al unirse a vitronectina, fibronectina o trombospondina, la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activada también puede mediar la adhesión de las plaquetas a estructuras subendoteliales y regular la agregación plaquetaria. El papel de la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activada en la agregación plaquetaria hace que sea un blanco terapéutico primordial en el tratamiento antitrombótico. En efecto, los anticuerpos, péptidos y no péptidos que se unen a la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ bloquean eficazmente a las plaquetas.

La FLN, una proteína asociada con la actina y fundamental para la unión con las integrinas, es crítica en la propagación y para la migración celular, está implicada como un regulador clave de la señalización de las integrinas, de afuera hacia adentro de la plaqueta. El dogma actual es que la FLN, que estabiliza la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ inactiva, es desplazada por la talina para promover la activación de la integrina (señalización de adentro hacia afuera).^{23-24,29}

Vías de activación plaquetaria

Las plaquetas humanas pueden ser activadas por numerosos agonistas a través de diferentes vías, aparte de los procesos discutidos anteriormente sobre la activación plaquetaria inducida por el vWF y el colágeno, en particular, la trombina y el ADP desempeñan funciones importantes en el fenómeno de activación plaquetaria en los seres humanos. La proteasa de serina trombina, es la molécula más potente como agonista y activa las plaquetas a través de receptores activados por proteasas (PAR) y GPIb-IX-V. Los cuatro PAR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G con siete hélices α que se extienden de manera transmembranal, cuatro dominios extracelulares en forma de bucles, y los dominios intracelulares PAR-1 y PAR-4 median la mayor parte de la respuesta plaquetaria a la trombina, mientras que el PAR-2 no es expresado en plaquetas y el PAR-3 funciona sólo como cofactor para la activación del PAR-4 por trombina. Mientras que el PAR-1 es sensible a concentraciones bajas de trombina, el PAR-4 desencadena la activación plaquetaria y la agregación sólo a altas concentraciones de trombina. La escisión del PAR-4 por la trombina se produce entre 20 y 70 veces más lentamente que la escisión del PAR-1. El bloqueo anti-PAR-1 mediado por anticuerpos y los antagonistas del PAR-1 bloquean la activación de plaquetas con bajas concentraciones de trombina, mientras que los anticuerpos bloqueantes del PAR-4 no afectan a la activación inducida por trombina. Por lo tanto, el PAR-1 es el receptor más importante para la activación de plaquetas humanas por trombina. El ADP es una de las principales moléculas para la liberación de las plaquetas activadas y su papel es muy importante en el proceso de activación plaquetaria.

La activación y la agregación mediada por ADP fueron reconocidas hace más de 50 años. Actúa como agonista de dos proteínas G purinérgicas acopladas a los siguientes receptores: el P2Y1 acoplado a la fracción Gq y el P2Y12 acoplado a la fracción Gi. Al igual que otros receptores P2Y, P2Y1 y P2Y12 son proteínas transmembranales a siete pasos y poseen un dominio intracitoplasmático con un C-terminal y un dominio extracelular con un N-terminal. La activación de P2Y1 inicia la agregación plaquetaria inducida por ADP y es responsable del cambio de forma de las plaquetas. Sin embargo, sin activación del P2Y12, el resultado es una plaqueta pequeña y con agregación reversible, la estimulación del P2Y12 produce amplificación y estabilización de la respuesta de agregación. Es necesario un complejo de interacción entre el P2Y1 y el P2Y12 y coactivación de ambos, para la

agregación plaquetaria completa. El receptor P2Y₁₂ se ha convertido en un objetivo importante de la terapia antiplaquetaria.

Varias moléculas adaptadoras se unen a las colas citoplasmáticas de las β -integrinas y facilitan la señalización bidireccional, que es fundamental en la hemostasia y en la trombosis, e interfiriendo con el adaptador de la integrina y de las interacciones espaciales o temporales para inhibir la trombosis sin afectar la hemostasia, puede ser una estrategia atractiva para el desarrollo de fármacos antitrombóticos seguros.

El tiempo en que se forma el complejo 14-3-3 ζ -c-Src-integrina- β 3 durante la activación plaquetaria está mediado por el fragmento -PIRLGLLANFSVFYEE- (PE16) en el dominio 14-3-3 ζ y en el dominio SH2 en c-Src, mientras que la interacción 14-3-3 ζ -integrina- β 3 está mediado por el fragmento -ESKVFYLMKMGDYRYL- (EL17) y en la cola citoplasmática de la integrina β 3 por el fragmento -KEATSTF- (KF7).

El inhibidor del motivo EL17, o péptido KF7, interfiere con la formación del complejo 14-3-3 ζ -c-Src-integrina- β 3 e inhibe selectivamente la señalización del dominio β 3 de afuera hacia adentro, sin afectar la interacción integrina-fibrinógeno, lo que suprime la trombosis sin causar sangrado significativo.^{23-24,30-31}

Micropartículas plaquetarias

Una de las formas de valorar la función plaquetaria en condiciones fisiológicas y patológicas, es el estudio cualitativo y cuantitativo de las micropartículas. Las micropartículas plaquetarias son portadoras de transducción de señales intracelulares, estos vehículos bioquímicos incluyen proteínas, ARNm, microARN y otras sustancias bioactivas. Las plaquetas son una fuente importante de micropartículas circulantes y las micropartículas están estrechamente asociadas con el desarrollo de ciertas enfermedades cardiovasculares y oncológicas. Las micropartículas extraídas de plaquetas pueden obtenerse a través del estímulo mecánico con vórtex o tratamiento con trombina.

Las cuentas, composición, tamaños y estructuras internas de las micropartículas pueden determinarse por citometría de flujo y por microscopía electrónica de transmisión (MET). Las plaquetas pueden activarse fácilmente y expresar una gran cantidad de micropartículas con composiciones complejas variables, con estructuras y tamaños distintos. Las micropartículas plaquetarias de alta pureza se pueden obtener derivadas de plaquetas mediante gradiente de centrifugación. Sin embargo, las micropartículas derivadas de plaquetas estimuladas por tratamiento con trombina o agitación (vórtex) pueden diferir significativamente en los niveles de CD63.³²⁻³³

Apoptosis plaquetaria

La homeostasis entre la producción y la eliminación de plaquetas es esencial para la salud humana. La faceta crítica del equilibrio que facilita la eliminación de plaquetas de la circulación es la apoptosis (muerte celular programada genéticamente). Los mecanismos celulares precisos que sustentan la apoptosis plaquetaria no están definidos. En las células nucleadas, se sabe que la reorganización del citoesqueleto de actina regula la apoptosis plaquetaria tardía. Sin embargo, el papel del citoesqueleto de actina en la regulación de la apoptosis en las plaquetas no se ha estudiado exhaustivamente ya que son partículas anucleadas y exhiben una característica fisiológica distintiva.

Se ha inducido la apoptosis en plaquetas humanas lavadas utilizando ABT-737, un fármaco similar al borano (BH3). El ABT-737 es una molécula pequeña que inhibe Bcl-2 y Bcl-xL, dos miembros de la familia de proteínas Bcl-2, conservadas evolutivamente que comparten dominios de homología Bcl-2 (BH), identificada como un senolítico (un fármaco que induce selectivamente la muerte celular en células senescentes). Las células senescentes regulan positivamente las proteínas antiapoptóticas Bcl-

w y Bcl-xl. La inhibición conjunta de Bcl-w y Bcl-xl mediante ARNip (ARN de interferencia/ARN silenciador) o la molécula pequeña ABT-737 induce específicamente la apoptosis en células senescentes.³⁴

En partículas anucleadas como las plaquetas, la apoptosis es un fenómeno que inicia con una serie de señales mitocondriales. La despolarización mitocondrial se ha medido utilizando el colorante radiométrico JC-1; la exposición superficial a fosfatidilserina (PS) se ha medido mediante la unión de anexina V; la medición de la caspasa 3 se ha realizado mediante *Western Blot*. Se ha reportado que los marcadores apoptóticos no se han encontrado con el uso del fármaco despolimerizante de actina citocalasina D o de la molécula polimerizante de actina, jasplacínolida (jaspamida).³⁵

Se han aislado plaquetas en estado natural o (del inglés, *wild type* WT) en modelos murinos con y sin deficiencia de gelsolina, una proteína de unión a la actina que es esencial para el funcionamiento normal y remodelación del citoesqueleto. En respuesta al ABT-737, las plaquetas nulas en gelsolina inicialmente mostraron una exposición acelerada a la PS en relación con las plaquetas WT, sin embargo, tanto las plaquetas WT como las carentes de gelsolina han exhibido niveles similares de despolarización mitocondrial y activación de la caspasa-3 en respuesta al ABT-737.³⁶ Existen marcadores de apoptosis plaquetaria independientes de la actina.³⁷

Conclusiones

- Las plaquetas o trombocitos son elementos formes de la sangre, que es un tejido con una particularidad física, es un tejido conectivo altamente especializado y líquido.
- En un ser humano adulto circulan aproximadamente un billón de plaquetas.
- Las plaquetas se derivan del fraccionamiento del citoplasma de los megacariocitos, en la médula ósea. Diariamente se producen 100 mil millones de nuevas plaquetas, para mantener la cuenta de plaquetas entre 150 y 400 $10^9/L$ de sangre total.
- La vida media plaquetaria varía entre 8 a 10 días. Luego, son extraídas de la circulación sanguínea por elementos celulares y no celulares del sistema monocítico macrofágico, principalmente en el bazo.
- Las plaquetas contienen un sistema canalicular abierto, un sistema tubular denso, organelas y gránulos secretorios especializados (gránulos alfa y gránulos densos). Es decir, un sistema complejo de endomembranas.
- La forma de disco biconvexo de las plaquetas en reposo se preserva mediante el citoesqueleto formado principalmente por microtúbulos, espectrina y microfilamentos de actina, y sus proteínas asociadas.
- Las plaquetas intervienen principalmente en la hemostasia y en la trombosis, además de participar en otras funciones vinculadas con la angiogénesis y el sistema inmunitario, por ejemplo.
- La fisiología de las plaquetas está relacionada con la integridad estructural de los vasos sanguíneos. Al ocurrir una lesión vascular, las plaquetas se activan, se adhieren y se agregan, sufriendo cambios bioquímicos importantes, degranulación y cambios morfológicos notables.

Para este trabajo, declaramos no poseer potenciales conflictos de intereses.

Referencias documentales consultadas

1. Kelly K and Dumont L. Frozen platelets. *Transfusion and Apheresis Science*. 2019; 58(1):23-29.
2. Heemskerk J and West J. Emerging Technologies for Understanding Platelet Diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2022;(42):540-552. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.317092>

3. Mendoza C, Gumá JA. Tejido Sanguíneo. Publicaciones de la Unidad Académica de Histología Normal y Embriología. Instituto Anatómico José Izquierdo. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Marzo, 1998. También publicado por la Unidad Académica de Histología de la Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida, 1999.
4. Thon N and Italiano JE. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. Harvard Medical School, Boston, MA, USA. Department of Surgery, Vascular Biology Program, Children's Hospital, Boston, MA, USA. e-mail: jitaliano@rics.bwh.harvard.edu P. Gresele et al. (eds.), Antiplatelet Agents, Handbook of Experimental Pharmacology 210, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012:3-22. doi 10.1007/978-3-642-29423-5_1
5. Hein S, Visser M, Zimmermann M, Wesche J, Adams P, Theuerkauf S, et al. FcγRIIA-specific DARPins as novel tools in blood cell analysis and platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 2023;299(6):104743:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104743>
6. Yoshimoto Y, Hasebe T, Takahashi K, Amari M, Nagashima S, Kamijo A, et al. Ultrastructural Characterization of Surface-Induced Platelet Activation on Artificial Materials by Transmission Electron Microscopy. *Microscopy Research and Technique.* 2013;76:342–349.
7. Li A, Chen J, Liang Z-H, Cai J, Cai H-H and Chen M. Comparison of ultrastructural and nanomechanical signature of platelets from acute myocardial infarction and platelet activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;486(2):245-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.009>
8. De Kock L and Freson K. The (Patho) Biology of SRC Kinase in Platelets and Megakaryocytes *Medicina.* 2020;56(633):1-11 doi:10.3390/medicina56120633
9. Hally K, Fauteux-Daniel S, Hamzeh-Cognasse H, Larsen P and Cognasse F. Revisiting Platelets and Toll-Like Receptors (TLRs). *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;(21)6150:1-28. doi:10.3390/ijms21176150
10. White JG. Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. *The American Journal of Pathology.* 1968;53:281-291.
11. Florian S and Mitchison T.J. Anti-microtubule drugs. En: Chang P, Ohi R, editores. *The Mitotic Spindle: Methods in molecular biology*, vol 1413. Humana Pre. New York; 2017:403-21.
12. Pennings G, Reddel C, Traini M, Campbell H, Chen and Kritharides L. Colchicine inhibits ROS generation in response to glycoprotein VI stimulation. *Scientific Reports.* 2021;11:11965. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91409-7>
13. Kobsar A, Pfeifroth A, Klingler P, Niklaus M, Schubert J, Kuhn S, et al. Composition of plasma in apheresis-derived platelet concentrates under cold storage. *Blood Transfus.* 2023;21:327-336. doi: 10.2450/2022.0057-22
14. <https://www.terumobct.com/reveos>, consultado el 13 de marzo de 2024.
15. Bermejo E. Plaquetas. Artículo de Revisión. Sociedad Argentina de Hematología. *Fisiología de la hemostasia normal. Hematología.* 2017;21 N° extraordinario10-18.
16. Braathen H, Felli T, Assmus J, Gjerde K, Klæboe E, Strandenes G and Oveland T. In vitro quality of cold and delayed cold-stored platelet concentrates from interim platelet units during storage for 21 days. *Vox Sanguinis.* 2023;118:463–470.
17. George C, Saunders C, Morrison A, Scorer T, Jones S and Dempsey N. Cold stored platelets in the management of bleeding: is it about bioenergetics? *Platelets.* 2023;34:1-9. doi: 10.1080/09537104.2023.2188969
18. Palma-Barqueros V, Bury L, Kunishima S, Lozano M, Rodríguez-Alen A, Revilla N, et al. Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia. *Blood Advances.* 2021;(5)24:5453-5467. doi 10.1182/bloodadvances.2020004057
19. Kenney D and Linck R. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *Journal of Cell Science.* 1985;78:1-22.
20. Cuenca E, Ferrer F, Rivera J and Teruel R. 1 Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(3484):1-13. doi:10.3390/ijms20143484
21. Mitrugno A, Rigg R, Laschober N, Ngo A, Pang, J, Williams C, et al. Potentiation of TRAP-6-induced platelet dense granule release by blockade of P2Y12 signaling with MRS2395. *Platelets.* 2018;(29)4:383-394.
22. Carmona B, Marinho H, Lopes C, Nolasco S and Soares H. Tubulin Post-Translational Modifications: The Elusive Roles of Acetylation. *Biology.* 2023;12(4):561-603. <https://doi.org/10.3390/biology12040561>
23. Gremmel T, Frelinger A and Michelson A. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016;42:191-204.
24. Scridon, A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis-From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;12772:2-18. <https://doi.org/10.3390/ijms232112772>.
25. Matharu S, Nordmann C, Ottman K, Akkem R, Palumbo D, Cruz D, et al. Deep learning, 3D ultrastructural analysis reveals quantitative differences in platelet and organelle packing in COVID-19/SARSCoV2 patient-derived platelets. *Platelets, Platelets.* 2023; Platelets.2023;34(1):1–12. doi: <https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2264978>

26. van Bergen M, Marneth A, Hoogendijk A, van Alphen F, van den Akker E, Laros-van Gorkom B, et al. Specific proteome changes in platelets from individuals with GATA1-, GFI1B-, and RUNX1-linked bleeding disorders. *Blood*. 2021;(138)1:86-89.
27. Fouassier M, Babuty A, Debord C and Béné M. Platelet immunophenotyping in health and inherited bleeding disorders, a review and practical hints. *Clinical Cytometry*. 2020;98:464–475.
28. Frelinger A, Rivera J, Connor D, Freson K, Greinacher A, Harrison P, et al. Consensus recommendations on flow cytometry for the assessment of inherited and acquired disorders of platelet number and function: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost*. 2021;19:3193-3202.
29. Liu J, Lu F, Ithychanda S, Apostol M, Das M, Deshpande G, Plow E and Qin J. A mechanism of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ outside-in signaling through a novel integrin αIIb subunit-Filamin-actin linkage. *Blood*. 2023;(141)21:2629-2641.
30. Augustine T, van der Spuy W, Kaberry L and Shayi M. Thrombin-Mediated Platelet Activation of Lysed Whole Blood and Platelet-Rich Plasma: A Comparison Between Platelet Activation Markers and Ultrastructural Alterations. *Microscopy & Microanalysis*. 2016;22:630–639 doi:10.1017/S1431927616000854
31. Shen C, Liu M, Xu R, Wang G, Li J, Chen P, et al. The 14-3-3 ζ -c-Src-integrin- β3 complex is vital for platelet activation. *Blood*. 2020;136(8):974-988.
32. Guo J, Feng C, Zhang B, Zhang S, Shen X, Zhu J and Zhao X. Extraction and identification of platelet-derived microparticles. *Molecular Medicine Reports*. 2019. 20:2916-2921. doi: 10.3892/mmr.2019.10484
33. Li X, Ma Y, Liu C, Pu F, Zhang Y and Wang D. Platelet membrane-derived microparticles may be biomarkers in patients with hepatocellular carcinoma and can promote the invasion and metastasis of hepatoma carcinoma cells. *Transfusion*. 2023;63:1821-1831. doi: 10.1111/trf.17499
34. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*. 2016;7:11190. doi: 10.1038/ncomms11190
35. Sokolovskaya A, Popov M, Sergeeva E, Metelkin A, Zybin D, Shumakov D and Kubatiev A. Investigation of Platelet Apoptosis in Patients after Surgical Myocardial Revascularization. *Biomedicines*. 2023;11(2):251-262. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020251>
36. Xie L, Xu D, Cai X, Zhang Z, Yu W, Qiu J, et al. Apoptosis in platelets from adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2021; 32(7):434-42. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001054>
37. De Silva E, Paul M and Kim H. Apoptosis in platelets is independent of the actin cytoskeleton. *PLoS ONE*. 2022. 17(11): e0276584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276584>