



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Defectos de Sialilación: Importancia en el
Sistema Hemostático**

D^a Nuria Revilla Calvo

2019

Agradecimientos

A mis directores, Javier y Marisa, verdaderos iniciadores de este trabajo. Por su orientación, apoyo, profesionalidad e impulso continuo. Es un verdadero honor comenzar esta etapa con vosotros como referente profesional. Eternamente agradecida a ambos.

Al Profesor Vicente Vicente. Por la gran oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. Es un auténtico privilegio poder formar parte de un grupo como este.

A todos los compañeros del Servicio de Hematología y Oncología médica del Hospital Morales Meseguer, Hospital Reina Sofía y especialmente del Centro Regional de Hemodonación. Por hacerme sentir como en casa desde el primer día y por vuestra incesante colaboración a nivel asistencial e investigacional.

De forma especial quisiera agradecer a Toñi y Uge. Por su inmensa generosidad.

A todos los compañeros del Hospital Ramón y Cajal. Por despertar mi pasión por la Hematología y apoyarme en mi andadura a Murcia.

A mi familia, mis padres, mi hermana, Jorge y Víctor: Agradecimiento incommensurable. Hacemos el mejor de los equipos.

A mis amigos. Por las experiencias compartidas durante estos años.

Y por último, pero no por ello menos importante, agradecer a todos los pacientes y sus familias, la principal motivación para el desarrollo de este trabajo y mi profesión.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María Luisa Lozano Almela, Profesora Titular de Universidad del Área de Hematología en el Departamento de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Defectos de sialilación: importancia en el sistema hemostático", realizada por D^a. Nuria Revilla Calvo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Septiembre de 2019

D. Javier Corral de la Calle, Profesor Titular de Universidad del Área de Hematología en el Departamento de Medicina , AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Defectos de sialilación: importancia en el sistema hemostático", realizada por D^a. Nuria Revilla Calvo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Septiembre de 2019

Índice

ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	15
1. Modificaciones post-traduccionales.....	17
1.1. Glicosilación.....	20
1.2. Ácido siálico.....	23
2. Sistema hemostático.....	29
2.1. Modificaciones post-traduccionales en el sistema hemostático.	30
2.2. Glicosilación en el sistema hemostático.....	34
2.2.1. Implicaciones fisiológicas.....	40
i. Plaquetas.....	41
a) Protección e integridad de la membrana.....	42
b) Envejecimiento y turnover de plaquetas.....	44
ii. Antitrombina.....	47
a) Glicoformas alfa y beta.....	50
b) Regulación del contenido de glicanos durante el desarrollo (estudios murinos en ratones neonatos).....	52
2.2.2. Implicaciones patológicas.....	53
i. Plaquetas.....	54
a) Enfermedad coronaria y diabetes (hiperreactividad plaquetaria).....	54
b) Almacenamiento <i>in vitro</i>	55
c) Sepsis.....	56
d) Trombopenia inmune (PTI)	57
e) Macrotrombocitopenia congénita por defecto sialilación.....	57
f) Enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario.....	58
ii. Antitrombina.....	59
a) Defectos congénitos de glicosilación (CDG).....	59
b) Mutaciones en <i>SERPINC1</i> que generan nuevos sitios de N-glicosilación.....	60
c) Mutaciones en <i>SERPINC1</i> que eliminan secuencias de N-glicosilación.....	64

2.2.3.	Aplicaciones terapéuticas	65
i.	Plaquetas.....	67
a)	Transfusión de plaquetas almacenadas a largo plazo.....	68
b)	Estrategias para mejorar el rendimiento transfusional tras el almacenamiento de las plaquetas.....	69
c)	Transfusión de plaquetas refrigeradas.....	70
ii.	Antitrombina.....	71
a)	Antitrombina humana recombinante (ATryn®)..	72
b)	AT-N135Q-Pro394 (antídoto de fondaparinux)..	73
3.	Referencias.....	75
OBJETIVOS.....		99
CAPÍTULO I		
DESIALILACIÓN TRANSITORIA EN COMBINACIÓN CON UNA NUEVA DEFICIENCIA DE ANTITROMBINA ASOCIADA A TROMBOSIS GRAVE Y RECURRENTE BAJO TRATAMIENTO ANTICOAGULANTE.....		103
1.	Introducción.....	105
2.	Material y Métodos.....	106
2.1.	Recogida de muestras.....	106
2.2.	Screening de trombofilia.....	106
2.3.	Estudio molecular del gen <i>SERPINC1</i>	107
2.4.	Western Blot	107
2.5.	Estudios de glicómica básica.....	109
2.4.1.	Tratamiento enzimático del plasma.....	109
2.4.2.	Análisis de glicoformas de la transferrina (HPLC).....	109
2.6.	Estudios de glicómica avanzada: Q-TOF de la transferrina....	110
2.7.	Modelo recombinante.....	110
3.	Resultados.....	111
3.1.	Caso clínico.....	111
3.2.	Estudio de trombofilia.....	112
3.3.	Desialilación generalizada de proteínas plasmáticas.....	116
3.4.	Desialilación transitoria y variable de proteínas plasmáticas....	122
4.	Discusión.....	125
5.	Conclusión.....	128
6.	Referencias.....	130

CAPÍTULO II

TROMBOPENIA INMUNE PRIMARIA MULTIREFRACTARIA; CONSIDERANDO LA DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO.....137

1. Introducción.....	139
2. Material y Métodos.....	141
2.1. Diseño del estudio y recogida de muestras.....	141
2.2. Especificidad de anticuerpos anti-glicoproteínas plaquetarias (Modified antigen-capture ELISA).....	143
2.3. Citometría de flujo.....	144
2.4. Niveles séricos de trombopoyetina.....	144
2.5. Tratamiento con oseltamivir.....	145
2.6. Estudio de proteínas plasmáticas.....	145
2.5.1. Western Blot (Antitrombina, Factor XI).....	146
2.5.2. HPLC (Transferrina).....	146
2.7. Análisis estadístico.....	147
3. Resultados.....	148
3.1. Especificidad de anticuerpos antiplaquetarios.....	149
3.2. Caracterización biológica de pacientes con PTI multirefractaria.....	150
3.3. Desialilación de proteínas hepáticas.....	153
3.4. Niveles séricos de trombopoyetina en pacientes multirefractarios.....	155
3.5. Respuesta a oseltamivir.....	157
4. Discusión.....	158
5. Conclusión.....	167
6. Referencias.....	168

CAPÍTULO III

PAPEL DEL ÁCIDO SIÁLICO EN EL SISTEMA HEMOSTÁTICO: RESULTADOS DE UN MODELO *IN VITRO*.....177

1. Introducción.....	179
2. Material y Métodos.....	182
2.1. Modelo de desialilación <i>in vitro</i>	182
2.2. Actividad funcional de proteínas plasmáticas: métodos cromogénicos y Western blot.....	183
2.3. Estudios globales del sistema hemostático: tiempos de la coagulación y generación/degradación del coágulo de fibrina.....	185
2.4. Estudios funcionales plaquetarios: agregación plaquetaria y	

citometría de flujo.....	186
2.5. Test de sensibilidad a la hemólisis.....	188
2.6. Estudio molecular del extremo C-terminal del gen del factor H (CFH).....	189
3. Resultados.....	190
3.1. Verificación de la desialilación en las diferentes muestras.....	190
3.2. La eliminación enzimática del ácido siálico no tiene efecto en los estudios globales del sistema hemostático	192
3.3. Efecto de la desialilación completa <i>in vitro</i> en proteínas plasmáticas de la coagulación.....	194
3.4. Reactividad plaquetaria en muestras no activadas	200
3.5. Reactividad plaquetaria inducida por agonistas	203
3.6. Efecto del ácido siálico en la hemólisis.....	207
4. Discusión.....	210
5. Conclusión.....	225
6. Referencias.....	227
CONCLUSIONES.....	237
ANEXO I.....	241
1. Publicaciones.....	243
2. Comunicaciones a congresos internacionales.....	243
3. Comunicaciones a congresos nacionales.....	244
4. Premios	245
RESUMEN EN INGLÉS.....	247
RESUMEN EN CASTELLANO.....	253

Abreviaturas

aCL: anti cardiolipina

AMR: receptor Ashwell-Morell

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AT: antitrombina

a β 2GPI: anti beta2-glicoproteína I

CDG: defectos congénitos de glicosilación

CIE: inmunoelectroforesis cruzada

CMP-Neu5Ac: citosina 5'-monofosfato ácido N-acetilneuramínico

COX: ciclooxigenasa

CXCL12: factor 1 derivado de células estromales

DANA: ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico

DM: diabetes mellitus

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FH: factor H

FII: factor II (protrombina)

FIX: factor IX

FV: factor V

FVII: factor VII

FVIII: factor VIII

FvW: factor von Willebrand

FX: factor X

FXI: factor XI

FXII: factor XII

FXIII: factor XIII

GGCX: γ -glutamil carboxilasa

Glb1: beta-galactosidasa 1

GNE: UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa / N-acetilmanosamina quinasa

GP: glicoproteína

GPI: glicosilfosfatidilinositol

Hb: hemoglobina

HexB: hexosaminidasa B

HPLC: cromatografía líquida a alta presión

IF: intensidad de fluorescencia

IFM: intensidad de fluorescencia media

IGIV: inmunoglobulinas intravenosas

LacNAc: lactosaminoglicano tipo 2

LRR: receptores ricos en leucina

MAT: microangiopatía tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

MPT: modificaciones post-traduccionales

NANP: Neu5Ac-9-fosfato fosfatasa

NANS: Neu5Ac 9-fosfato sintetasa

NEU: neuraminidasa

NR: ausencia de respuesta

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PC: proteína C

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

phAT: antitrombina derivada de plasma humano

PKA: proteinkinasa A

PKC: proteinkinasa C

PPP: plasma pobre en plaquetas

PRP: plasma rico en plaquetas

PTI: trombopenia inmune

PTT: púrpura trombocitopénica trombótica

Q-TOF: espectrometría de masas de alta resolución

R: respuesta

RC: respuestas completas

RCL: loop de centro reactivo

RE: retículo endoplásmico

RES: sistema reticuloendotelial

rhAT: antitrombina humana recombinante

RIQ: rango intercuartílico

RT: temperatura ambiente

SHU: síndrome hemolítico urémico

SHUa: síndrome hemolítico urémico atípico

TEP: tromboembolismo pulmonar

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular

TP: tiempo de protrombina

TPO: trombopoyetina

TPO-RA: agonistas del receptor de la trombopoyetina

TPST: tirosilprotein sulfotransferasa

TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado

TVP: trombosis venosa profunda

TxA2: tromboxano A2

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VKOR: vitamina K oxidorreductasa

WT: silvestre

Introducción

1. Modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) son los cambios químicos que las proteínas pueden sufrir después de su traducción. Se ha estimado que hasta el 80% de todas las proteínas eucariotas presentan algún tipo de MPT (Jensen, 2006).

Las MPT son las principales responsables tanto de la existencia de una gran variabilidad de proteínas sintetizadas a partir de un mismo gen como de la modulación de las múltiples funciones que puede desempeñar una misma secuencia aminoacídica. Si bien se estima que el genoma humano comprende entre 20.000 y 25.000 genes, el número total de proteínas en el proteoma humano se estima en más de 1 millón. La recombinación genómica, la iniciación de la transcripción en promotores alternativos, la terminación diferencial de la transcripción y el procesamiento alternativo de intrones son mecanismos que generan diferentes transcritos de ARN mensajero a partir de un solo gen. Además, pueden existir inicios alternativos de traducción como fuente adicional de diversidad molecular. Pero sin duda, las MPT representan la principal base de la complejidad del proteoma en relación con el transcriptoma y el genoma. Sin embargo, no sólo están implicadas en la gran diversidad proteica. Las MPT también desempeñan un papel fundamental en la regulación del plegamiento proteico, su orientación a compartimentos subcelulares específicos, su vida media, su interacción con ligandos u otras proteínas y su estado funcional, como la actividad catalítica en el caso de enzimas o la función de señalización de proteínas involucradas en vías de transducción de señal. La interacción entre las enzimas modificadoras y de-modificadoras permite un control rápido y económico de la función proteica; puesto que un control similar por degradación de proteínas y síntesis de novo tomaría mucho más tiempo y consumiría mucha más bioenergía. Las MPT están involucradas en la regulación de casi todos los eventos celulares, incluyendo la expresión génica, la

transmisión de señales, las interacciones proteína-proteína, las interacciones célula-célula y la comunicación entre el espacio intra- y extracelular (Deribe *et al*, 2010). Por lo tanto, alteraciones en las MPT afectarán a la fisiología de la célula en todo su conjunto.

Además de la relevancia fisiológica de las MPT, recientes evidencias están mostrando nuevos papeles que las MPT pueden tener en el desarrollo de diferentes patologías y las posibilidades terapéuticas derivadas de modificaciones en MPT de ciertas proteínas.

Las proteínas son biomoléculas formadas por cadenas de aminoácidos, que están ordenados en una secuencia precisa, adoptando una conformación tridimensional, pero flexible. Estos polipéptidos se pliegan durante su propia síntesis generando configuraciones nativas necesarias para ejercer sus funciones biológicas. Las funciones de las proteínas son muy diversas, desde proporcionar a la célula su soporte estructural en el citoesqueleto, hasta favorecer reacciones químicas (enzimas), controlar el tráfico intracelular y el flujo de sustancias entre la célula y el exterior o regular la propia expresión de genes. Pero para estas funciones, especialmente para aspectos de regulación funcional y especificidad, no sólo la secuencia aminoacídica, ni siquiera la estructura terciaria que presentan, es suficiente. Modificaciones posteriores a la síntesis proteica, las MPT, van a jugar un papel crucial en aspectos claves de la práctica totalidad de las proteínas, además de contribuir a su variabilidad.

Las MPT engloban todos los cambios covalentes que experimenta una proteína tras su síntesis en el ribosoma y que afectan a las características fisicoquímicas de la proteína. Todas estas modificaciones pueden ser resultado de mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. Son además, modificaciones muy diversas ya que se han descrito más de 200 tipos de MPT. La localización celular donde se llevan a cabo es muy variada, desde el núcleo hasta la matriz extracelular, dependiendo del tipo de MPT. Por ello,

toda MPT puede afectar a la correcta función biológica de la proteína y, de hecho, en muchos casos es el mecanismo seleccionado para dar respuesta a una determinada señal.

Las modificaciones más comunes son la ruptura específica de las proteínas precursoras (proteólisis); formación de puentes disulfuro; o adición o eliminación covalente de grupos de bajo peso molecular, lo que conduce a modificaciones tales como acetilación, metilación, fosforilación, acilación, glicosilación, hidroxilación, sulfatación o ubiquitinación (Figura 1).

Figura 1. Tipos de modificaciones postraduccionales.



(Imagen cedida por la Dra. de la Morena-Barrio ME)

Las MPT mediadas por enzimas son tan relevantes para un organismo que hasta el 5% del genoma humano se encarga de codificar enzimas modificadoras implicadas en

MPT (Boyer, 2006). De ellas, 518 son cinasas (incorporan grupos fosfato), más de 150 fosfatasas, más de 600 ubiquitinligasas y más de 80 desubiquitininas. La importancia de las MPT, por ejemplo la fosforilación (Hunter, 2009) y la proteólisis (Ciechanover, 2005) es innegable en diferentes procesos biológicos y patológicos. Este trabajo se centra en una de ellas, la glicosilación.

1.1. Glicosilación

Una de las MPT más relevantes es la glicosilación. Aproximadamente la mitad de las proteínas que se expresan en una célula experimentan esta modificación, que implica la adición covalente de porciones de azúcar a aminoácidos específicos. La mayoría de las proteínas solubles y unidas a la membrana expresadas en el retículo endoplasmático, proteínas secretadas, receptores de superficie y ligandos, así como ciertas proteínas del interior de los orgánulos e incluso algunas proteínas citoplasmáticas y nucleares están glicosiladas. Los lípidos y proteoglicanos también se pueden glicosilar, aumentando significativamente el número de sustratos para este tipo de modificación.

La glicosilación es la MPT que más contribuye a aumentar la diversidad del proteoma. Casi todos los aspectos de la glicosilación se pueden modificar y presentan amplia heterogeneidad: el enlace glucosídico (el sitio de unión del glicano); la composición, estructura y longitud del glicano.

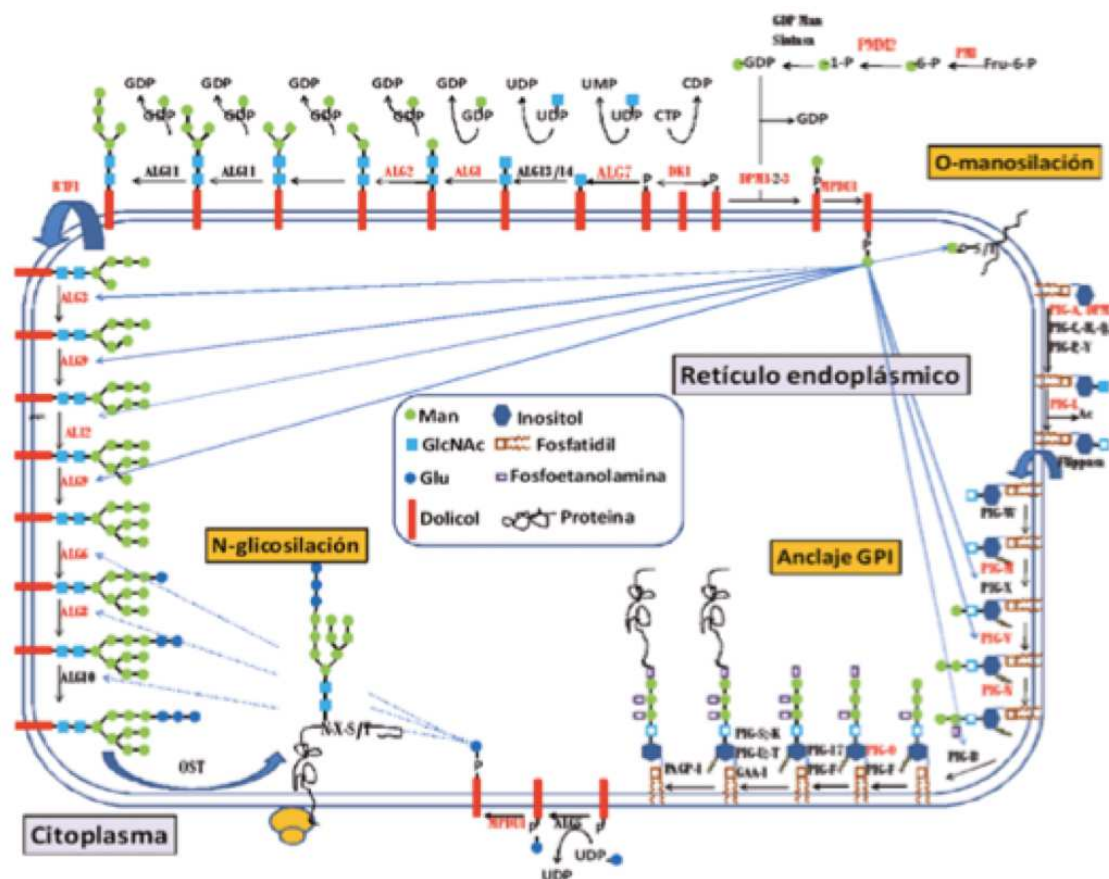
La glicosilación se produce en el interior del retículo endoplasmático, aparato de Golgi y membrana plasmática mediante procesos extensos en los que intervienen múltiples enzimas y requieren complejos y heterogéneos procesos de maduración (Boyer, 2006). Los eventos de la glicosilación incluyen la unión de monosacáridos, la transferencia de azúcares de un sustrato a otro y el recorte de azúcares de la estructura

del glicano. Se trata de un proceso de reacciones de las enzimas involucradas altamente ordenado, en el que la actividad enzimática individual depende de la finalización de la reacción enzimática previa.

Las enzimas que transfieren mono- u oligosacáridos de las moléculas donantes a las cadenas o proteínas de oligosacáridos en crecimiento se denominan glicosiltransferasas (Spiro, 2002). Cada una tiene especificidad para vincular un azúcar particular a un sustrato en las llamadas ruta de la N-glicosilación, ruta de la O-manosilación y ruta de la formación de glicosilfosfatidilinositol (GPI), dependiendo del residuo en el que lleven a cabo su acción: N- (Asn), O- (Ser, Thr) y anclaje glicosilfosfatidilinositol (Gly en C-terminal) respectivamente (Figura 2).

La actividad opuesta es responsabilidad de las glicosidasas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos para eliminar los azúcares de las proteínas. Estas enzimas son críticas para el procesamiento de glicanos en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Cada enzima muestra especificidad para eliminar un azúcar particular (por ejemplo, la manosidasa sobre la manosa).

Figura 2. Rutas de glicosilación



(Imagen cedida por la Dra. de la Morena-Barrio ME)

La glicosilación de las proteínas tiene múltiples funciones en la célula. En el retículo endoplásmico, la glicosilación se usa para controlar el **plegamiento** de proteínas, actuando como un mecanismo de control de calidad para garantizar que sólo las proteínas correctamente plegadas pasen al Golgi. Estos azúcares también pueden actuar como **ligandos** para los receptores en la superficie de la célula para mediar en el reconocimiento extracelular o estimular las vías de transducción de señales (Wormald *et al*, 2002). Gracias a que pueden ser voluminosos y acaban con un residuo cargado negativamente (el ácido siálico, del que hablaremos en detalle posteriormente), los

oligosacáridos pueden **regular las interacciones proteína-proteína** facilitando o evitando que las proteínas se unan a dominios de interacción afines, es decir, confiriendo especificidad. Además, otorgan a la proteína **estabilidad** y pueden alterar la **solubilidad**; esta última cualidad debido a que son hidrofílicos (Rudd & Dwek, 1997).

Desde el punto de vista biológico, la glicosilación es una modificación que afecta significativamente la masa y la carga de prácticamente la totalidad de las proteínas secretadas y expresadas en la superficie celular. Alteraciones cuantitativas o cualitativas del glicano pueden afectar al plegamiento y secreción y/o a la interacción de la proteína afectada (y con ello, las características inmunológicas, la capacidad funcional o el aclaramiento). Desarrollaremos con mayor detenimiento el elemento terminal de la cadena del glicano que se adiciona en la red trans-Golgi: el ácido siálico.

1.2. Ácido siálico

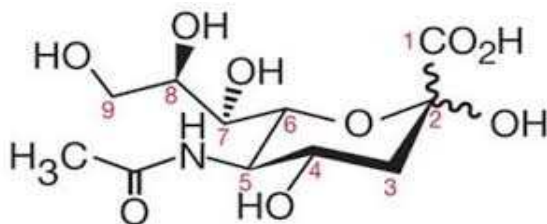
El ácido siálico es el elemento terminal de los componentes glucídicos y consta de nueve átomos de carbono (Figura 3).

El término “ácido siálico” proviene del griego “sialos” cuyo significado es saliva. El compuesto fue descubierto por Blix, en 1936, cuando lo aisló de la mucina de las glándulas submaxilares bovinas (Lundblad, 2015) y por Klenk, en 1941, al aislar un derivado del ácido neuramínico ($C_9H_{17}NO_8$) a partir de glicolípidos del cerebro de enfermos con la enfermedad de Tay-Sachs (asociada a una acumulación de gangliósidos, en particular el GM2, por deficiencia en la enzima *N*-acetil-hexosaminidasa).

El ácido siálico más común es el ácido *N*-acetilneuramínico, $C_{11}H_{19}NO_9$, abreviado

habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA (Figura 3); por ello, al ácido sialico también se le suele denominar como ácido *N*-acetilneuramínico.

Figura 3. Ácido siálico.

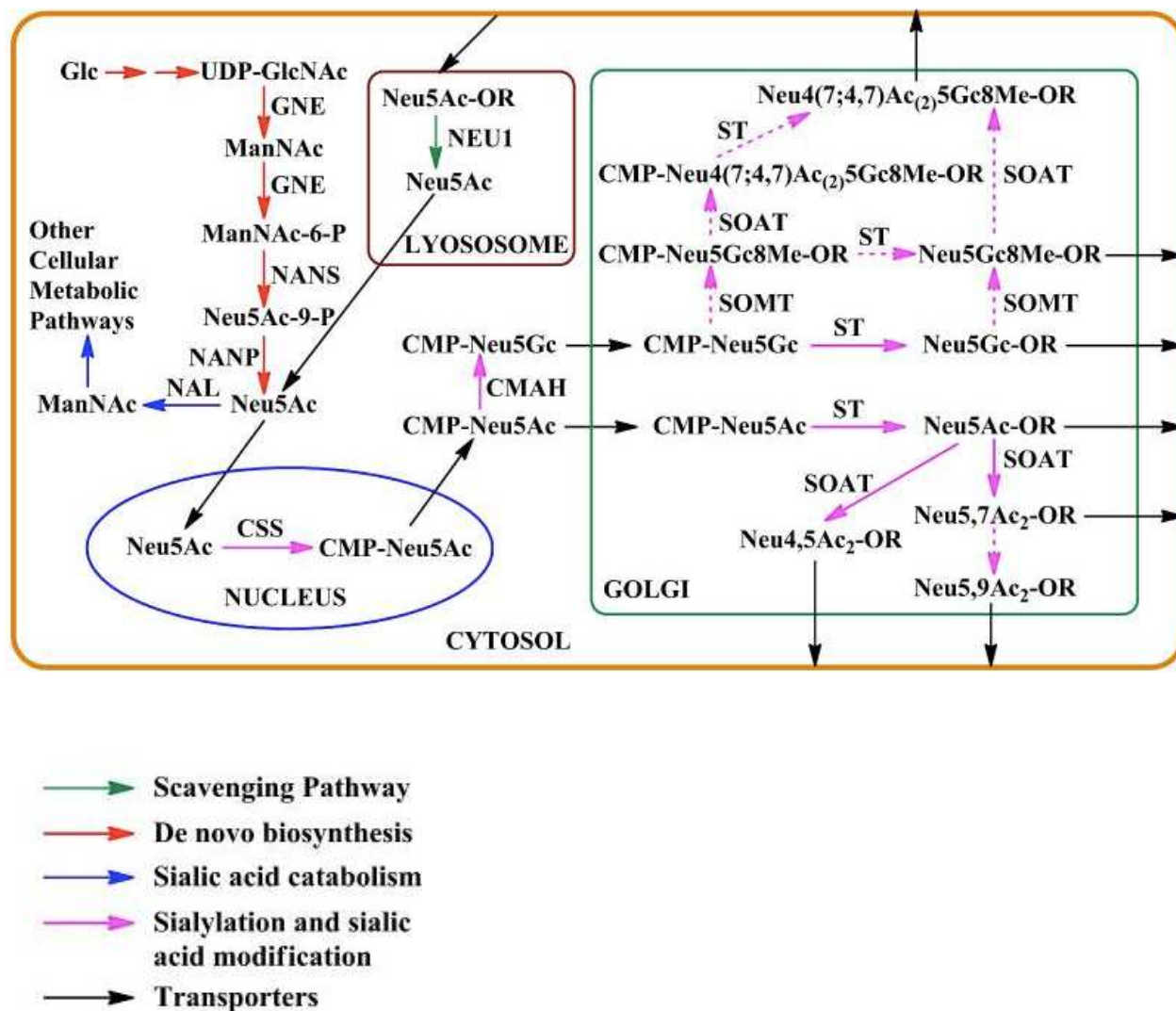


En todos los vertebrados se han encontrado ácidos siálicos en forma libre o formando parte de estructuras macromoleculares. En el hombre están presentes en el líquido cefalorraquídeo, saliva, suero y orina, pero lo más frecuente es que se encuentren formando parte de estructuras macromoleculares glucídicas tales como glicoproteínas y gangliósidos.

La biosíntesis del ácido siálico en vertebrados tiene lugar en el citosol e implica tres enzimas en un proceso de cuatro pasos (Figura 4). Los dos primeros pasos están catalizados por una enzima bifuncional UDP-*N*-acetilglucosamina 2-epimerasa / *N*-acetilmanosamina quinasa, llamada GNE (Reinke *et al*, 2009). La función epimerasa del GNE convierte UDP-GlcNAc en ManNAc con eliminación del resto UDP y epimerización de GlcNAc. La función quinasa de GNE posteriormente fosforila a ManNAc para formar ManNAc-6-P. Neu5Ac se produce por las reacciones de condensación y desfosforilación catalizadas por Neu5Ac 9-fosfato sintetasa (NANS) y Neu5Ac-9-fosfato fosfatasa (NANP), respectivamente (Varki & Schauer, 2009).

El Neu5Ac sintetizado en el citosol es transportado al núcleo y activado por la citosina 5'-monofosfato ácido N-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) sintetasa (EC 2.7.7.43) para formar CMP-Neu5Ac que luego va al aparato de Golgi, donde diversas sialiltransferasas forman glicoconjugados que posteriormente se secretan o se integran en la superficie celular (Li & Chen, 2012).

Figura 4. Metabolismo del ácido siálico en eucariotas.



(Li & Chen, 2012)

Abreviaturas: Glc, glucosa; UDP-GlcNAc, uridina 5'-difosfo-N-acetilglucosamina; ManNAc, N-acetilmanosamina; ManNAc-6-P, N-acetilmanosamina 6-fosfato; Neu5Ac-9-P, ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico; CMP-Neu5Ac, citidina, ácido 5'-monofosfo-N-acetilneuramínico; CMP-Neu5Gc, citidina, ácido 5'-monofosfo-N-glicolilneuramínico; R, glucoproteína o glicolípido. Enzimas: GNE, UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa / N-acetilmanosamina quinasa; NANS, Neu5Ac-9-P sintetasa; NANP, Neu5Ac-9-P fosfatasa; NAL, N-acetilneuraminato liasa; CSS, CMP-ácido siálico sintetasa; CMAH, citidina monofosfato-ácido N-acetilneuramínico hidroxilasa; ST, sialiltransferasa; SOAT, sialato-O-acetiltransferasa; SOMT, sialato-O-metiltransferasa; NEU1, sialidasa lisosomal.

La posición terminal de los ácidos siálicos en glicoproteínas y gangliósidos, así como en membranas celulares externas tiene una gran importancia en biología celular. Precisamente, estos monosacáridos ácidos pueden interaccionar con los componentes de otras superficies celulares, sustancias extracelulares y receptores, lo que se evidencia por los múltiples eventos de reconocimiento celular en los que están implicados. Su carga neta negativa impone un potencial electrostático significativo. Determinan la naturaleza ácida y la microheterogeneidad electroforética a las glicoproteínas, aportándoles, además, una serie de propiedades específicas que en muchos casos les permiten actuar como receptores para micoplasmas (Manchee & Taylor-Robinson, 1969), lectinas vegetales y animales (Greenaway & LeVine, 1973; Fernández-Morán *et al*, 1968), virus (Tong *et al*, 2017) y bacterias (Johnston *et al*, 2008; Brittan *et al*, 2012; North *et al*, 2017). Asimismo, son responsables de la antigenicidad de determinados anticuerpos de grupos sanguíneos específicos (Springer & Desai, 1975), intervienen en interacciones célula a célula relacionadas con la diferenciación celular (Tanida *et al*, 2013), participan en procesos de adhesión celular (Janik *et al*, 2010) y constituyen uno de los elementos principales de las mucosas endoteliales, siendo responsables de la viscosidad así como de las interacciones huésped-microorganismos (Ouwerkerk *et al*, 2013).

Los ácidos siálicos terminales de glicolípidos y glicoproteínas se liberan en los lisosomas por acción de sialidasas como parte de la degradación global de estos glicoconjugados, volviendo de nuevo al citosol, donde pueden pasar por otro ciclo de síntesis de glicoconjugado sialílico o descomponerse por acción de Neu5Ac liasa (o ácido siálico aldolasa) para formar ManNAc y piruvato (Figura 4). Se han encontrado múltiples sialidasas en células humanas: NEU1, localizada en lisosomas (Pshezhetsky *et*

al, 1997); NEU2, en el citosol (Monti *et al*, 1999); NEU3, la sialidasa asociada a la membrana plasmática (Wada *et al*, 1999) y NEU4, la lisosomal o asociada a la membrana mitocondrial o lisosomal (Monti *et al*, 2004). Estas cuatro sialidasas humanas tienen especificidades de sustrato y funciones fisiológicas diferentes (Monti & Miyagi, 2012).

En microorganismos, los ácidos siálicos están presentes en un número escaso de bacterias y hongos. La mayoría de las bacterias no pueden sintetizar ácido siálico a excepción de un número limitado de bacterias patógenas y saprófitas cuya mayoría están relacionadas con humanos. Algunas bacterias usan ácido siálico como nutriente (Severi *et al*, 2007). Otras bacterias patógenas pueden utilizarlo para sialilar su propia superficie, protegiéndose de la detección del sistema inmune del huésped afectando a la interacción del complemento y regulando negativamente las respuestas inmune innata y adaptativa (Nardy *et al*, 2016). El reconocimiento del ácido siálico por Siglecs, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas que se unen al ácido siálico y se expresan principalmente por las células del sistema hematopoyético, podría desempeñar un papel en la regulación del sistema inmune innato (Crocker & Varki, 2001).

Por otro lado, las proteínas secretadas tienen vidas medias diferentes que determinan su cantidad en plasma y su función. El proceso de regulación de la homeostasis de proteínas secretadas consiste en la remodelación glicosídica secuencial de N-glicanos desenmascarando así los ligandos de receptores de lectina endocíticos endógenos. Casi todas las proteínas secretadas se modifican postraduccionalmente con la unión covalente de N-glicanos (Figura 5). Recientemente se ha descrito un mecanismo intrínseco de envejecimiento de la proteína secretada y turnover vinculado a la eliminación por etapas de los sacáridos terminales unidos a los N-glicanos (Yang *et al*, 2015). Las glicosidasas

endógenas, que incluyen neuraminidasa 1 (Neu1), neuraminidasa 3 (Neu3), beta-galactosidasa 1 (Glb1) y hexosaminidasa B (HexB), poseen actividades hidrolíticas que remodelan temporalmente las estructuras de N-glicanos, exponiendo progresivamente diferentes sacáridos a medida que la proteína envejece. Posteriormente, las lectinas endocíticas con especificidades de unión distintas, que incluyen el receptor Ashwell-Morell (AMR), la integrina α M y el receptor de manosa del macrófago, participan en el reconocimiento del ligando N-glicano y en el recambio de proteínas secretadas.

Figura 5. Representación esquemática de una proteína con 2 N-glicanos maduros



(Imagen cedida por la Dra. de la Morena-Barrio ME)

Abreviaturas: Asn, asparagina; NAcGlc, N-Acetil glucosamina.

Todos estos cambios, sin duda, tendrán consecuencias en el equilibrio del sistema hemostático, como veremos a continuación.

2. Sistema hemostático

Hemostasia, que se define como la detención de la hemorragia, proviene del griego:

“hemo” que significa sangre y “stasis” que significa detener. Este equilibrio entre la trombosis y la hemorragia se mantiene gracias a múltiples interacciones complejas y específicas entre los factores de la coagulación, el sistema fibrinolítico, las plaquetas y la pared del vaso. Por lo general, el sistema hemostático está bajo el control inhibitorio, limitando así la formación de coágulos en un medio donde existe una extensa diversidad de proteínas (Nedelkov *et al*, 2005). Este delicado equilibrio se interrumpe cada vez que aumenta la actividad procoagulante o disminuye la actividad de los inhibidores naturales. Así, el sistema hemostático se verá perturbado por traumas, citocinas o agentes infecciosos, pero también por reacciones enzimáticas que sufren determinadas proteínas plasmáticas.

2.1. Modificaciones post-traduccionales en el sistema hemostático

La coagulación sanguínea así como su equivalente anticoagulante, el sistema de la proteína C, la antitrombina y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), funcionan a través de la formación de complejos enzimáticos de macromoléculas asociadas a las células que interactúan de manera controlada y precisa. En el último paso de la coagulación se genera trombina, que escinde fibrinógeno soluble para formar los monómeros de fibrina insolubles que constituyen la base estructural de un coágulo de sangre.

Las MPT juegan un papel fundamental tanto en la coagulación sanguínea como en el sistema anticoagulante puesto que el sistema hemostático es muy dependiente de las interacciones proteína-proteína. La secuenciación de proteínas de la coagulación permitió la identificación de tres tipos de aminoácidos modificados en las proteínas de la coagulación antes de que se encontraran en proteínas pertenecientes a otros sistemas.

El primero fue el ácido γ -carboxiglutámico (Gla) en 1974, que está formado por la γ -carboxilación dependiente de la vitamina K de los residuos de ácido glutámico (Stenflo *et al*, 1974). Luego siguió el ácido eritro- β -hidroxiaspártico (Hya) y la eritro- β -hidroxiasparagina (Hyn), que se forman por hidroxilación del ácido aspártico y los residuos de asparagina, respectivamente (Drakenberg *et al*, 1983; Stenflo *et al*, 1987). En ese momento, la coagulación sanguínea pasó a llamarse la “cascada de la coagulación” (Davie, 2003). Hansson y Stenflo describieron las MPT que ocurren en las proteínas de la coagulación sanguínea (Tabla 1) y algunas de sus implicaciones funcionales (Hansson & Stenflo, 2005).

Tabla 1. MPT de los factores de la coagulación.

Protein	Post-translational modification
Factor V	N-glycosylation: Asn23, Asn27, Asn211, Asn269, Asn354, Asn432, Asn440, Asn526, Asn639, Asn713, Asn724, Asn732, Asn748, Asn754, Asn793, Asn910, Asn949, Asn1046, Asn1055, Asn1075, Asn1078, Asn1175, Asn1193, Asn1229, Asn1238, Asn1265, Asn1283, Asn1310, Asn1319, Asn1347, Asn1356, Asn1451, Asn1471, Asn1531, Asn1675, Asn1982, Asn2181 Phosphorylation: Ser692 for platelet casein kinase II, at least two sites on the light chain for protein kinase C Sulfation: Tyr665, Tyr696, Tyr698, Tyr1494, Tyr1510, Tyr1515, Tyr1565
Factor VIII	N-glycosylation: Asn41, Asn239, Asn582, Asn757, Asn784, Asn828, Asn900, Asn943, Asn963, Asn1001, Asn1055, Asn1066, Asn1185, Asn1255, Asn1259, Asn1282, Asn1300, Asn1384, Asn1412, Asn1442, Asn1512, Asn1685, Asn1810, Asn2118 Phosphorylation: Thr351, Ser1657 Sulfation: Tyr346, Tyr718, Tyr719, Tyr723, Tyr1664, Tyr1680
Factor VII	γ -Carboxylation: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu35 β -Hydroxylation: Asp63 N-glycosylation: Asn145, Asn322 O-glycosylation (-Glc): Ser52, (-Fuc): Ser60
Factor IX	γ -Carboxylation: Glu7, Glu8, Glu15, Glu17, Glu20, Glu21, Glu26, Glu27, Glu30, Glu33, Glu36, Glu40 β -Hydroxylation: Asp64 N-glycosylation: Asn157, Asn167 O-glycosylation (-GalNAc): Thr159, Thr169, Thr172, Thr179, (-Glc): Ser53, (-Fuc): Ser61 Phosphorylation: Ser158 Sulfation: Tyr155
Factor X	γ -Carboxylation: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32, Glu39 β -Hydroxylation: Asp63 N-glycosylation: Asn181, Asn191 O-glycosylation: Thr159, Thr171, Thr443
Prothrombin	γ -Carboxylation: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32 N-glycosylation: Asn78, Asn100, Asn373
Protein C	γ -Carboxylation: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29 β -Hydroxylation: Asp71 N-glycosylation: Asn97, Asn248, Asn313, Asn329
Protein Z	γ -Carboxylation: Glu7, Glu8, Glu11, Glu15, Glu17, Glu20, Glu21, Glu26, Glu27, Glu30, Glu33, Glu35, Glu40 β -Hydroxylation: Asp64 N-glycosylation: Asn59, Asn185, Asn193, Asn266, Asn292 O-glycosylation: Ser53, Thr72, Ser196, Thr275
Protein S	γ -Carboxylation: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32, Glu36 β -Hydroxylation: Asp95, Asn136, Asn178, Asn217 N-glycosylation: Asn458, Asn468, Asn489
Antithrombin	N-glycosylation: Asn96, Asn135, Asn155, Asn192
Protein C inhibitor	N-glycosylation: Asn230, Asn243, Asn319
von Willebrand factor	N-glycosylation: Asn94, Asn384*, Asn468*, Asn752, Asn811, Asn1460, Asn1527, Asn1594, Asn1637, Asn1783, Asn1822, Asn2027 O-glycosylation: Thr485, Thr492, Thr493, Ser500, Thr705, Thr714, Ser723, Thr724, Thr916, Thr1535 Sulfation of carbohydrates: Asn384, Asn468

The table is based on information obtained from the online database SWISS-PROT.

(Hansson & Stenflo, 2005)

Un ejemplo de MPT con gran peso en hemostasia es la **fosforilación**. La gran mayoría de las reacciones de fosforilación ocurre intracelularmente y se relaciona con la transducción de señales. La reacción de fosforilación es catalizada por un grupo de proteínas quinasas que transfieren un grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácidos en una proteína. En las células animales, las cadenas

laterales de Ser, Thr y Tyr pueden estar sujetas a fosforilación, aunque existe la posibilidad de que la histidina también sea un sustrato. Las proteínas de la coagulación donde se ha observado fosforilación son: FV, FVIII, FIX y protrombina (Tabla 1). El factor Va se fosforila en la cadena pesada en Ser692 por una CKII asociada a la membrana de la plaqueta y en dos sitios en la cadena ligera por una isoforma de proteína quinasa C derivada de plaquetas, mientras que FVIII contiene sitios de fosforilación en Thr351 y Ser1657. La fosforilación de la cadena pesada de FVa en Ser692 aumenta la tasa de inactivación del cofactor por PCa, motivo por el que se ha sugerido que desempeña un papel en la regulación negativa de la coagulación (Kalafatis, 1998). La fosforilación también es una MPT clave en la regulación de la reactividad plaquetaria (Gibbins, 2004).

Otro ejemplo de MPT importante en hemostasia es la **sulfatación**. La sulfatación de la tirosina (Tyr) tiene lugar en el aparato de Golgi. La enzima tirosilprotein sulfotransferasa (TPST) cataliza la transferencia de sulfato del donador de sulfato universal 3'-fosfato-5'-fosfosulfato (PAPS) al grupo hidroxilo de un resto de peptidil tirosina para formar un éster de tirosina O⁴-sulfato y 3',5'-ADP. Los FV y FVIII humanos tienen varios residuos de Tyr sulfatados mientras que FIX está sulfatado en un solo sitio (Tyr 155; Tabla 1). La sulfatación de FV es necesaria para la actividad procoagulante completa, ya que la inhibición de la sulfatación de tirosina por el clorato de sodio da como resultado una molécula de cofactor con aproximadamente un 80% de actividad (Pittman *et al*, 1994b). La actividad reducida se ha atribuido a una activación mediada por trombina más lenta y a una actividad cofactor intrínseca reducida de FVa. Del mismo modo, se requiere la sulfatación de tirosina de FVIII para una actividad procoagulante completa, así como para una unión óptima al factor von Willebrand

(FvW) (Leyte *et al*, 1991). La sulfatación de Tyr1680 en FVIII parece ser de crucial importancia para la hemostasia; una mutación puntual en el gen FVIII que conduce a la sustitución de aminoácidos Tyr1680Phe y se asocia con la hemofilia A (Higuchi *et al*, 1990). En base a estudios donde los residuos Tyr seleccionados en FVIII fueron mutados a Phe, se sugirió que la sulfatación de Tyr346 y Tyr1664 acelera la tasa de activación de trombina y que la sulfatación en Tyr718, Tyr719 y Tyr723 aumenta la actividad cofactor intrínseca de FVIIIa (Michnick *et al*, 1994). De acuerdo con esto, una mutación Tyr346Cys de origen natural da como resultado un fenotipo de hemofilia (Mumford *et al*, 2002).

De forma más extensa, desarrollaremos una de las MPT más frecuentes en el sistema hemostático, la glicosilación, atendiendo a sus implicaciones fisiopatológicas y a las aplicaciones terapéuticas que se relacionan con esta MPT.

2.2. Glicosilación en el sistema hemostático

Los dos cofactores homólogos, **FV** y **FVIII**, son ampliamente O- y N-glicosilados, especialmente dentro de los dominios B. Se ha demostrado que los hidratos de carbono son importantes para la secreción, ya que la inhibición de la N-glicosilación mediante el tratamiento con tunicamicina reduce drásticamente la secreción tanto de FV como de FVIII (Pittman *et al*, 1994a). Se ha sugerido que los oligosacáridos con alto contenido en manosa del dominio B del FVIII representan el sitio de interacción principal para las proteínas chaperonas calnexina y calreticulina y son responsables de la interacción con la lectina de manosa LMAN1 (Pipe *et al*, 1998; Cunningham *et al*, 2003). Los oligosacáridos N-ligados pueden así participar en las interacciones de plegamiento

dentro del RE así como facilitar el transporte de RE al Golgi. Además, estudios recientes han demostrado que los restos de carbohidratos en el procofactor V, pero no en el cofactor derivado, FVa, alteran sustancialmente su susceptibilidad a la inactivación catalizada por PCa (Fernández *et al*, 1997; Silveira *et al*, 2002). Por lo tanto, los carbohidratos ligados a asparragina asociados con la región de la cadena pesada parecen proteger al FV, pero no al FVa, de la inactivación catalizada por PCa.

El FVa activado por trombina aparece como dos isoformas, que tienen masas y cargas moleculares ligeramente diferentes; FVa1 y FVa2. La heterogeneidad es causada por la glicosilación parcial en Asn2181 en el dominio C2 de la cadena ligera, debido a la presencia de Ser en lugar de Thr en la tercera posición en la secuencia de consenso de glicosilación. Se ha demostrado que el FVa1 glicosilado posee una menor afinidad por las superficies de la membrana, lo que resulta en una actividad procoagulante reducida, en concreto a bajas concentraciones de fosfolípidos.

Se conoce una mutación natural que se asocia con trombosis venosa en FV (Ile359Thr; factor V^{Liverpool}), que crea una nueva secuencia de consenso potencial para la N-glicosilación dentro de la cadena pesada de FV (Mumford *et al*, 2003). La cadena adicional de carbohidratos en la posición 359 interfiere con la interacción de FVa con PCa y proteína S (Steen *et al*, 2004). Como resultado, la anticoagulación se ve afectada por un mecanismo dual; en primer lugar, la regulación a la baja mediada por PCa del mutante está alterada, tanto en presencia como en ausencia de la proteína S; y en segundo lugar, el FV mutante es un cofactor pobre de PCa para la inactivación del FVIIIa. Las mutaciones naturales que crean nuevos sitios de glucosilación potenciales también se han descrito en el FVIII (Met1772Thr e Ile566Thr), donde los carbohidratos adicionales son responsables de la patogénesis de hemofilia A severa (Aly *et al*, 1992), aunque no se conoce cómo estas cadenas laterales de carbohidratos afectan la actividad

biológica de la proteína.

El factor VIII circula en plasma en un complejo no covalente con el FvW. Esta interacción aumenta la supervivencia del FVIII en la circulación protegiéndolo de la inactivación por PCa y FXa. El FvW maduro está compuesto por subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro, cada una con 12 oligonucleótidos ligados a N y 10 a O. Los oligosacáridos ligados a N son inusuales en comparación con los de otras proteínas plasmáticas porque contienen estructuras de grupos sanguíneos ABO. Uno o ambos de los oligosacáridos unidos a Asn384 y Asn468 están sulfatados. Se ha demostrado que la inhibición de la glicosilación ligada a N que causa la tunicamicina afecta la conformación de FvW de tal forma que no puede producirse dimerización y las moléculas monoméricas de FvW resultantes se retienen en el RE (Wagner *et al*, 1986).

El **factor tisular**, el cofactor que junto con el FVIIa circulante inicia la coagulación, tiene tres sitios de glicosilación unidos a N: Asn11, Asn124 y Asn137. La función de los carbohidratos no está clara, ya que pueden eliminarse sin pérdida de actividad (Martin *et al*, 1995).

En los **FVII** y **FIX** humanos, una glucosa unida a O y una fucosa unida a O se localizan en el primer dominio de tipo EGF. En el caso de FIX, la unión de unidades de azúcar adicionales a la fucosa ligada a O en Ser61 da lugar a una estructura de tetrasacárido (Sia- α 2,6-Gal β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O-Ser) idéntico a los encontrados en la proteína Notch1. Se conoce que los glicanos de O-fucosa en el dominio extracelular de Notch1 son esenciales para la señalización y función de la proteína (Moloney *et al*, 2000; Chen *et al*, 2001). El residuo de fucosa unido a Ser60 de

FVII aumenta ligeramente la afinidad de Ca^{2+} del módulo FVII-EGF1, pero parece no tener un efecto importante en la conformación del módulo. Las modificaciones de glucosa ligadas a O en FVII y FIX (en Ser52 y Ser53, respectivamente) están en forma de di o tri-sacárido con la estructura $\text{Xyl}_2\text{-Glc-O-Ser}$. La forma de disacárido carece de la xilosa terminal. Aún no se ha establecido un papel funcional para estos inusuales O-glicanos en el FVII y FIX. Además de los carbohidratos unidos a Ser presentes en el primer módulo de EGF, el FIX humano está parcialmente O-glicosilado en Thr159, Thr169, Thr172 y Thr179 (Hansson & Stenflo, 2005). También hay sitios para la unión de oligosacáridos unidos a N en los residuos de Asn 157 y 167 en el péptido de activación de FIX. Existen pocos datos definitivos sobre la importancia de estos glicanos.

El péptido de activación del **FX** humano tiene carbohidratos ligados a N unidos a Asn181 y Asn191, y carbohidratos ligados a O vinculados a Thr159 y Thr171. La conversión de FX a FXa por escisión en Arg194 da como resultado la liberación de un péptido de activación glicosilado de 52 residuos. No se conoce con exactitud si los carbohidratos en el dominio del péptido de activación de FX son importantes para su activación. Los estudios iniciales sugirieron un papel en la activación de FX, pero no se ha corroborado en estudios más recientes (Sinha & Wolf, 1993; Bharadwaj *et al*, 1995).

En la **protrombina** humana, se utilizan tres de los cuatro potenciales sitios de N-glicosilación; aquellos en Asn78, Asn100 y Asn373. Se ha descrito que las estructuras oligosacáridas ligadas a N contribuyen a la estabilidad del precursor de protrombina durante el procesamiento en el RE (Wu & Suttie, 1999).

La cadena pesada de la **proteína C** (PC) humana contiene tres carbohidratos ligados a N, y la cadena ligera uno más. Los N-glicanos intervienen en la secreción, el procesamiento proteolítico y la tasa de activación de la PC mediada por trombina. El carbohidrato en la posición Asn97 de la cadena ligera es importante para la secreción eficiente de PC, mientras que la glicosilación en Asn248 afecta el procesamiento en el sitio de escisión de Lys-Arg interno (Grinnell *et al*, 1991).

El cofactor no enzimático de la PC, la **proteína S**, está N-glicosilado en tres posiciones: Asn458, Asn468 y Asn489, todas dentro del dominio C-terminal LG2 de la región SHBG. Aproximadamente el 70% de la proteína S en la circulación se une a C4BP, un regulador del sistema del complemento. Solo la proteína S libre puede actuar como cofactor de la PCa. Los estudios *in vitro* han demostrado que los carbohidratos unidos a N tienen poca influencia sobre la actividad de la proteína S humana y no interfieren con la unión a C4BP (Lu *et al*, 1997; Giri *et al*, 2002). En la proteína S^{Heerlen} (Ser460Pro), la glicosilación normal de Asn458 no ocurre (Bertina *et al*, 1990). Esta mutación se encuentra con frecuencia entre los individuos diagnosticados con deficiencia de proteína S tipo III, que se caracteriza por bajos niveles de proteína S libre pero una concentración plasmática total normal de proteína S. La forma silvestre de la proteína S recombinante y la proteína S^{Heerlen} son igualmente activas como co-factores de PCa en la inactivación de FVa wild-type. Sin embargo, cuando se utiliza como sustrato de PCa el FVa^{Leiden}, portador de la mutación Arg506Gln, la proteína S^{Heerlen} muestra una pobre actividad como cofactor de PCa. Esto sugiere una sinergia entre la proteína S^{Heerlen} y el factor V^{Leiden} que podría dar lugar a un mayor riesgo de trombofilia en individuos portadores de ambos factores genéticos (Giri *et al*, 2000).

La **trombomodulina**, que desempeña un papel esencial como co-factor en la activación de la PC catalizada por trombina, tiene varios sitios potenciales de glicosilación ligada a N y O (Weiler & Isermann, 2003). Es una proteína unida a la membrana con dominios EGF-like que median la unión a la trombina. La unión cambia la especificidad de la trombina y la convierte de un coagulante a una enzima anticoagulante. La evidencia experimental ha indicado que un resto glicosaminoglicano unido a trombomodulina en el dominio rico en Ser/Thr localizado entre el sexto módulo EGF y el dominio transmembrana proporciona un sitio secundario de unión a trombina que participa en la activación de PC. También se cree que este glicano estimula la inactivación de la trombina por la antitrombina y el inhibidor de la PC.

Más recientemente, se ha demostrado de forma experimental que los N-glicanos de **ADAMTS-13** juegan un papel crucial en la regulación de su actividad. ADAMTS-13 es una desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 13, que actúa a nivel del dominio A2 del FvW escindiendo los multímeros ultragrandes que presentan una gran afinidad por las plaquetas. Los dominios CUB, en conjunto con algunos de los dominios de trombospondina adyacentes, propician la unión a A3 (el dominio donde se fija al FvW) mientras que el dominio espaciador se une a A2 (el dominio del FvW donde escinde el enlace peptídico Tyr842-Met843). La eliminación enzimática del ácido siálico terminal de los glicanos del dominio catalítico con función de metaloproteasa disminuye la actividad contra FRETs-VWF73 a pH 7,4 y frente al FvW de longitud completa bajo fuerzas de cizallamiento. Además, la pérdida de N-glicanos de los dominios CUB reduce significativamente la interacción con el dominio espaciador, regulando la actividad ADAMTS-13 (Nowak *et al*, 2017).

En este trabajo, detallaremos de forma más amplia las alteraciones en la glicosilación en dos elementos específicos del sistema hemostático: las plaquetas, como pieza fundamental de la hemostasia primaria y la antitrombina, como parte de la hemostasia secundaria.

2.2.1. Implicaciones fisiológicas

El papel de las MPT en hemostasia es esencial, tanto en la hemostasia primaria como en la hemostasia secundaria.

Las señales que reciben del exterior las **plaquetas** para desencadenar una respuesta (señales *outside-in*) se producen gracias a MPT como son la fosforilación/defosforilación de proteínas (por ejemplo, de los receptores de agonistas) y la oxidación/reducción (por ejemplo, del ácido araquidónico). Estas MPT guían la respuesta efectora oportuna, como es la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios que desencadenan la adhesión, activación y agregación plaquetaria. Lo mismo ocurre, pero en sentido inverso, con la señalización del interior al exterior celular (*inside-out*). En esta ocasión, entran en juego enzimas como las proteinkinasa A (PKA) o C (PKC), o la ciclooxigenasa (COX), las cuales modifican aminoácidos específicos de las proteínas dianas (por ejemplo, el tromboxano).

En el caso de los factores de la coagulación, todas las proteínas poseen algún tipo de MPT y cada una desempeña un papel diferente (Hansson & Stenflo, 2005). Dos ejemplos de ello son la activación proteolítica de la coagulación y la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K. Los factores de la coagulación se encuentran en la circulación como zimógenos (precursor enzimático carente de actividad catalítica).

La activación inducida por **proteólisis** es el fundamento de la cascada de coagulación, y culmina con la formación de trombina a partir de la protrombina y que es responsable de la formación del coagulo de fibrina. Algunas de estas reacciones proteolíticas precisan de cofactores y/o de la interacción con superficie de membrana (Smith *et al*, 2015). La **gamma-carboxilación** tiene lugar en el retículo endoplásmico y consiste en la transformación del ácido glutámico a carboxiglutámico por acción catalítica de la gamma-glutamyl carboxilasa, permitiendo que las proteínas afectadas puedan unirse a fosfolípidos de membrana. Esta unión es crucial para la formación de los complejos proteicos que soportan la cascada de la coagulación (Bandyopadhyay, 2008). Esta reacción permite además el “reciclaje” de la vitamina K, disminuyendo así los requerimientos diarios. Brevemente, la forma reducida de la vitamina K es oxidada. La reacción permite a la γ -glutamyl carboxilasa (GGCX) carboxilar residuos de ácido glutámico selectivos en las proteínas de la coagulación dependientes de la vitamina K. La vitamina K oxidada se recicla de nuevo a hidroquinona (forma reducida) gracias a la enzima vitamina K oxidorreductasa (VKOR).

En particular, en el caso de las plaquetas y de la antitrombina, la glicosilación tiene implicaciones fundamentales desde el punto de vista fisiológico.

i. Plaquetas

Las plaquetas son pequeños cuerpos citoplásmicos anucleados que circulan en el torrente sanguíneo. Estos fragmentos celulares se derivan de los megacariocitos en la médula ósea. Las plaquetas en reposo parecen pequeñas células discoides (2-4 μm por 0.5 μm), lo que facilita su marginación hacia la pared del vaso, donde pueden evaluar constantemente la integridad del endotelio vascular. La función principal de las

plaquetas es detener la pérdida de sangre después del trauma tisular y la exposición de la matriz subendotelial (George, 2000).

Una amplia variedad de receptores transmembrana móviles cubren la membrana plaquetaria, incluidas muchas integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$), receptores ricos en leucina (LRR) (Glicoproteína [GP] Ib/IX/V, Receptores Toll-like), siete receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) (receptores de trombina PAR-1 y PAR-4, receptores ADP P2Y₁ y P2Y₁₂, receptores TxA₂ TP $_{\alpha}$ y TP $_{\beta}$), proteínas pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas (GPVI, Fc γ RIIA), receptores de lectina de tipo C (P-selectina), receptores de tirosina quinasa (receptor de trombopoyetina, Gas-6, efrinas y efrina quinasa) y otros varios tipos (CD63, CD36, ligando 1 de selectina P, receptor de TNF-like, etc.) (Rivera *et al*, 2009). Muchos de estos receptores son compartidos por otros tipos de células, pero algunos solo se expresan en plaquetas, lo que permite interacciones específicas y respuestas funcionales a las proteínas adhesivas vasculares y a los agonistas plaquetarios solubles.

Las principales implicaciones fisiológicas de la glicosilación en el caso de las plaquetas son: el mantenimiento de la integridad de su superficie y la senectud de las plaquetas, regulando directamente la producción de las mismas.

a) Protección e integridad de la membrana

La búsqueda de los componentes de la superficie de las plaquetas que median la adhesión plaquetaria y la agregación de plaquetas comenzó a fines de la década de 1960 cuando el microscopio electrónico demostró la presencia de una capa externa cargada negativamente rica en carbohidratos que se llamó "glicocalix".

Al principio, se pensó que los principales contribuyentes de esta capa eran

mucopolisacáridos ácidos. Aunque los primeros estudios sugirieron que la mayoría de los mucopolisacáridos sulfatados sintetizados en megacariocitos son almacenados en gránulos (ahora se sabe que el condroitín-4-sulfato es un componente principal de los gránulos α donde forman un complejo junto con el factor 4 plaquetario), también se obtuvo evidencia de una presencia en la superficie plaquetaria. Progresivamente, se desarrollaron procedimientos electroforéticos que identificaron las principales glicoproteínas de membrana (GP) que constituyen esta capa.

Los estudios sobre los trastornos hereditarios de las plaquetas permitieron entonces la designación de los principales efectores de la función plaquetaria. Esto comenzó con el descubrimiento de que las plaquetas de pacientes con trombastenia de Glanzmann, un trastorno hereditario de la agregación plaquetaria, carecían de dos GP principales. Estudios posteriores establecieron el papel del complejo GPIIb-IIIa (ahora conocido como integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) en la unión de fibrinógeno y otras proteínas adhesivas en la activación plaquetaria y la formación de puentes proteicos que unen las plaquetas en su agregación. A este descubrimiento le siguió la observación de que las plaquetas de pacientes con síndrome de Bernard-Soulier, con macrotrombocitopenia y un claro trastorno de la adhesión plaquetaria, carecían de una GP rica en carbohidratos con carga negativa, la GPIb. Se demostró que GPIb, a través de su interacción con el FvW, participa en la adherencia de las plaquetas a los sitios lesionados en la pared del endotelio (Nurden, 2014).

Además, la GP Ib/IX, GPIa/IIa, GPVI, y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, con alto contenido en O-glicanos, realizan su función de adhesión y agregación plaquetaria uniéndose a colágeno, FvW endotelial y fibrinógeno, entre otros ligandos, mediante interacciones proteína-proteína en las que el contenido glucídico es esencial.

b) Envejecimiento y turnover de plaquetas

La megacariopoyesis suministra aproximadamente 10^{11} plaquetas por día con un nuevo turnover cada 8-9 días. Este proceso está influenciado por diversos cambios ambientales, manteniendo en condiciones normales una concentración de $150-400 \times 10^9/L$.

Las MPT están directamente implicadas en la senectud de las plaquetas y su aclaramiento, regulando también la producción plaquetaria para mantener un recuento normal de plaquetas de forma constante (Grozovsky *et al*, 2015b).

La trombopoyetina (TPO), descubierta en 1994 (McCarty *et al*, 1995), es la principal reguladora de la producción de plaquetas, manteniendo la supervivencia, proliferación y diferenciación de sus precursores en la médula ósea, los megacariocitos (Kaushansky, 2005, 2009). Múltiples órganos expresan transcritos de ARN de TPO, aunque son los hepatocitos los que expresan los niveles más altos y son los principales responsables de la síntesis y secreción de TPO en el torrente sanguíneo. La maduración de los megacariocitos y la formación de las plaquetas dependen de la migración celular de los primeros desde el nicho osteoblástico al vascular, donde una vez maduros, extienden unas proyecciones pseudopodiales, las proplaquetas, a través o entre las células de la capa endotelial sinusoidal y liberan plaquetas al torrente sanguíneo (Junt *et al*, 2007). La interacción del FvW del microambiente y su receptor en los megacariocitos, la GPIb-IX, parece importante para la formación y liberación de plaquetas, mientras que, por el contrario, el colágeno tipo I, que se localiza en el nicho osteoblástico, impide la formación de plaquetas (Balduini *et al*, 2008).

Se ha demostrado que las células del estroma de la médula ósea secretan TPO y CXCL12 (también llamado factor 1 derivado de células estromales), esta última una citoquina que atrae a los megacariocitos y a otras células hematopoyéticas al

microambiente medular (Hodohara *et al*, 2000). Una comunicación reciente muestra que tanto la TPO como CXCL12 regulan positivamente la trombopoyesis, al aumentar la transcripción de β 1,4-galactosiltransferasa 1 (β 4GalT1), y con ello la síntesis de un glicano concreto en los megacariocitos, el lactosaminoglicano tipo 2 (LacNAc), (Giannini *et al*, 2017).

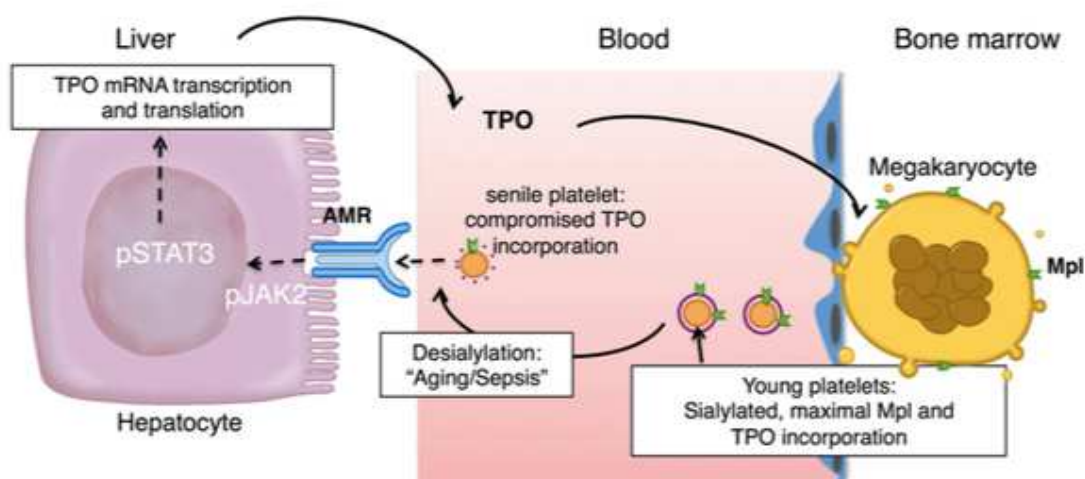
Cuando la TPO fue descubierta, se consideró que la síntesis de la misma era constitutiva y los niveles séricos de TPO se mantenían mediante su metabolización en plaquetas y megacariocitos (Cohen-Solal *et al*, 1996; Fielder *et al*, 1996). Sin embargo, estudios murinos (Ng *et al*, 2014; Meyer *et al*, 2014; Bender *et al*, 2015) y de pacientes con patologías asociadas a trombopenia (Ballmaier *et al*, 2001, 1997; Schrezenmeier *et al*, 1998; Gu *et al*, 2002), han contribuido al concepto de que la producción de TPO está regulada. Los niveles circulantes de TPO están regulados de manera compleja mediante su endocitosis gracias a su receptor (Mpl) en plaquetas y megacariocitos; y por la síntesis de TPO a nivel hepático, regulada a su vez por la interleucina 6 (IL-6). La IL-6 es una glicoproteína que se encuentra aumentada en estados inflamatorios (por ejemplo, artritis reumatoide, cáncer de ovario), produciendo un aumento de la expresión y síntesis del ARN mensajero (ARNm) de la TPO a nivel hepático tanto en hepatocitos *in vivo* como en como en células HepG2 y Hep3B *in vitro* (Wolber *et al*, 2001; Kaser *et al*, 2001; Stone *et al*, 2012).

Recientemente, se ha descubierto que la síntesis hepática de TPO también está regulada a través del aclaramiento de plaquetas desialiladas por procesos de senescencia a través de su aclaramiento via el receptor hepático Ashwell-Morrell (AMR) (Grozovsky *et al*, 2015a).

Hace más de 20 años que se conoce que la pérdida de ácido siálico en las plaquetas determina su vida media (Crook, 1990, 1991), lo novedoso es que la pérdida

de los ácidos siálicos terminales sea el factor determinante para la eliminación de plaquetas envejecidas de la circulación, estimulando la expresión de ARNm de TPO hepática *in vivo* e *in vitro* a través de JAK2 y del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 3 para aumentar el número de megacariocitos y la producción de plaquetas de novo (Figura 5) (Grozovsky *et al*, 2015a).

Figura 5. Síntesis de TPO hepática a través de la señalización de JAK2-STAT3 después del aclaramiento de plaquetas desialiladas por el receptor hepático Ashwell-Morrell. Los megacariocitos de la médula ósea producen y liberan plaquetas jóvenes que presentan ácido siálico en su superficie (anillo púrpura). Las plaquetas jóvenes internalizan al máximo la TPO a través de los receptores Mpl. Las plaquetas circulantes se desialilan a medida que envejecen mediante sialidasas activas (anillo violeta discontinuo), se vuelven ligandos para el AMR y son eliminadas por los hepatocitos. La señalización tras el aclaramiento de plaquetas desialiladas estimula positivamente la expresión de ARNm de TPO hepática mediante la activación de la vía JAK2-STAT3, liberando TPO al plasma, regulando así la homeostasis de la médula ósea y la trombopoyesis.



(Grozovsky *et al*, 2015b)

Estudios previos han mostrado que los glicanos de la superficie plaquetaria intervienen en el aclaramiento de las plaquetas (Hoffmeister, 2011). La pérdida del

ácido siálico probablemente esté mediada por la regulación al alza de las sialidasas plaquetarias, es decir, NEU1 y NEU3, expresadas en compartimentos granulares y en la membrana plasmática, respectivamente (Jansen *et al*, 2012). NEU1 y NEU3 tienen preferencia por el enlace del ácido siálico encontrado en los glicanos del complejo GPIb-IX, dejando expuestos los residuos de galactosa subyacentes. Las plaquetas desialiladas, ya sean por el envejecimiento, tratadas enzimáticamente con sialidasa o aisladas de ratones ST3Gal-42/2 (deficientes en α 2,3-sialiltransferasa IV), son eliminadas por el AMR hepático, un complejo de glicoproteína heteroligomérica transmembrana (GP) compuesto por dos subunidades: ASGPR1 (CLEC4H1, lectina hepática 1) y ASGPR2 (CLEC4H2, hepática lectina 2) (Sørensen *et al*, 2009; Grewal *et al*, 2008). AMR, inicialmente denominado receptor hepático asialo-GP, fue el primer receptor celular que se identificó y aisló, y la primera lectina que se detectó en mamíferos. Pertenece a la familia de receptores de lectina tipo C, implicadas en el reconocimiento, unión y eliminación de asialo-GP. Este receptor altamente conservado se ha considerado en gran parte como un receptor endocítico, y desde su descubrimiento hace 4 décadas, el papel regulador del AMR no se había dilucidado. Sin embargo, los recientes estudios muestran cómo las plaquetas desialiladas envejecidas regulan la producción de ARNm de TPO hepática *in vivo* a través de la AMR. Este mecanismo de retroalimentación presenta al conjunto AMR-plaqueta desialilada como un punto de control importante para la homeostasis de TPO y muestra que la expresión de TPO en los hepatocitos está regulada y no es exclusivamente constitutiva.

ii. Antitrombina

La antitrombina es una N-glicoproteína de síntesis hepática que se secreta al plasma donde alcanza concentraciones de 150 μ g/mL. El gen que codifica la

antitrombina, *SERPINC1*, se localiza en el cromosoma 1 (1q25.1) y tiene 7 exones. La proteína madura pierde un péptido señal de 32 aminoácidos y consta de 432 residuos, con una masa molecular tras la incorporación de los 4 N-glicanos biantenarios de 58 KDa. Dos puentes disulfuro intramoleculares completan las MPT que experimenta. En esta memoria la numeración empleada será la de la proteína completa, con péptido señal.

La antitrombina pertenece a la superfamilia de las serpinas, inhibidores de serín proteasas, un grupo de más de 1.000 proteínas con un elevado grado de homología estructural. Para poder desempeñar su papel inhibitorio se pliegan en una estructura metaestable, que no es la que mayor estabilidad estructural puede alcanzar. La razón no es otra que favorecer un efectivo y singular mecanismo de inhibición de la proteasa diana: un mecanismo de inhibición por suicidio. El centro reactivo de la serpina (RCL) actúa como cebo para la proteasa, que lo reconoce y ataca como a cualquier sustrato. Así, el corte del centro reactivo de la antitrombina por la proteasa diana induce un cambio conformacional en la antitrombina que afecta a la proteasa, distorsionando su centro catalítico y generando el complejo serpina-proteasa que se aclara rápidamente de la circulación (Huntington *et al*, 2000b). A diferencia de otras serpinas, en la forma nativa de la antitrombina, su centro reactivo está parcialmente insertado en la lámina beta central de la molécula, por lo que la actividad inhibitoria de la forma nativa de antitrombina está seriamente mermada. Para conseguir una actividad anticoagulante máxima la antitrombina requiere de la participación de un cofactor, que en la naturaleza son ciertos glicosaminoglicanos. La unión de la heparina genera un cambio conformacional en la molécula de antitrombina que provoca la exposición del RCL, haciéndolo más accesible a la proteasa diana, y aumentando así la capacidad anticoagulante hasta 1000 veces (Huntington *et al*, 2000a). Esta característica ha sido el

fundamento del uso clínico de las heparinas, uno de los fármacos más empleados en la historia.

Por este motivo, la antitrombina es considerada el principal anticoagulante endógeno del organismo. Su función anticoagulante la ejerce inhibiendo hasta 6 proteasas de la cascada de la coagulación, principalmente la trombina y el factor Xa, las dianas de los fármacos anticoagulantes más recientes (apixaban, ribaroxaban, dabigatrán y edoxaban). Por ello, defectos cuantitativos o cualitativos que afecten a este poderoso anticoagulante tendrán consecuencias significativas en el riesgo trombótico.

La deficiencia congénita de antitrombina tiene una baja incidencia en la población general (1/600-1/5.000) (Tait *et al*, 1994), y se debe principalmente a mutaciones y deleciones que afectan a *SERPINC1*. La sensibilidad estructural y funcional de la antitrombina hace que prácticamente cualquier cambio genético, incluso puntual que afecte a un solo aminoácido, tenga consecuencias deletéreas sobre la molécula. De hecho no existen polimorfismos missense en *SERPINC1*. Hasta 336 alteraciones genéticas diferentes se encuentran depositadas en la principal base de datos de mutaciones asociadas con deficiencia de antitrombina, y dos son los trabajos, ambos realizados en Alemania que incluyen las mayores series de pacientes con deficiencia de antitrombina caracterizados molecularmente (Caspers *et al*, 2012; Luxembourg *et al*, 2011). La deficiencia de antitrombina se clasifica en dos grandes tipos: tipo I, cuando los niveles antigénicos y funcionales son paralelos y bajos (en torno al 50%) y no se detectan variantes de antitrombina en plasma; y tipo II, cuando se detectan niveles significativos de formas variantes con menor o nula actividad anticoagulante en plasma. A su vez, dependiendo de la localización de la mutación y de sus consecuencias funcionales, las deficiencias tipo II se clasifican en: a) tipo II RC o reactivas, si la mutación afecta al RCL e interfiere con la reactividad de la antitrombina con las

proteasas diana; b) tipo II HBS del dominio de unión a heparina, si la mutación afecta a la interacción con la heparina o al cambio conformacional inducido por esta; y c) tipo II PE o pleiotrópicas, causadas por mutaciones principalmente localizadas en la lámina C que afectan tanto a la reactividad como a la afinidad por heparina (Lane *et al*, 1997).

En el ratón, la deficiencia completa de antitrombina en modelos clásicos *knock out*, provoca letalidad embrionaria (Ishiguro *et al*, 2000). En humanos no se ha identificado ningún caso con deficiencia completa de antitrombina, por lo que se asume que también causa letalidad embrionaria.

La glicosilación también tiene implicaciones fisiológicas en la antitrombina. Por un lado *in vivo* se detectan dos glicoformas de antitrombina alfa y beta y por otro, parece existir una regulación del contenido de los glicanos durante el desarrollo del organismo.

a) Glicoformas alfa y beta

Como se acaba de mencionar, la antitrombina presenta dos MPT: la formación de 3 puentes disulfuro intracatenarios y la N-glicosilación. De hecho, es una glicoproteína con 4 sitios de N-glicosilación. Debido a que uno de ellos, el localizado en posición Asn-167, no es eficazmente glicosilado (posiblemente porque la secuencia de glicosilación contiene Ser en vez de Thr), existen 2 glicoformas de antitrombina: alfa, con 4 N-glicanos y beta, con 3. Aunque parece que ambas glicoformas se secretan en proporciones similares, la forma alfa es mayoritaria en plasma (90%), ya que la glicoforma beta, al tener 1 glicano menos, presenta mayor capacidad de unión a los glicosaminoglicanos del endotelio vascular y es rápidamente eliminada de la

circulación, localizándose a nivel endotelial, donde se piensa que desempeña importantes funciones anticoagulantes (Frebelius *et al*, 1996).

De hecho, la mayor afinidad por heparina de la β -antitrombina sugiere que esta glicoforma sea el principal inhibidor *in vivo* de la trombina (Turko *et al*, 1993; Witmer & Hatton, 1991). La diferencia en la afinidad por heparina de las dos glicoformas la condiciona el glicano en Asn167 de la α -antitrombina, ya que dificulta el segundo paso en el mecanismo de activación inducido por heparina (Turk *et al*, 1997). Otra evidencia de la importancia de la glicosilación en la afinidad por heparina de la antitrombina fue generada en modelos recombinantes de antitrombina. La eliminación de cualquiera de las cuatro secuencias de N-glicosilación generaba variantes con mayor afinidad por heparina (Olson *et al*, 1997). Por otra parte, se han identificado variantes naturales de antitrombina que tienen alteraciones en el número de cadenas de glicanos y que pueden afectar a su actividad específica que se han relacionado con patología trombótica. Estas variantes se detallarán en el apartado de implicaciones patológicas de la antitrombina. Sin embargo, existe una variante causada por la mutación N167T, que produce una deficiencia leve de antitrombina (70%), identificada en un individuo asintomático (Bayston *et al*, 1999). Esta mutación induce el cambio nucleotídico AAC a ACC, dando como resultado una sustitución de un aminoácido, Asn167 a Thr. Esto altera la secuencia consenso de N-glicosilación y por lo tanto impide la glicosilación de este sitio. La consecuencia de la mutación es una mayor concentración de β -antitrombina, la fracción de antitrombina que se une con muy alta afinidad a la heparina (Bayston *et al*, 1999).

La eliminación de los ácidos siálicos terminales de la antitrombina no afecta su actividad específica, pero disminuye drásticamente la vida media *in vivo* de la proteína (Hansson & Stenflo, 2005).

b) Regulación del contenido de glicanos durante el desarrollo (estudios murinos en ratones neonatos)

Los niveles de antitrombina en neonatos están severamente disminuidos en comparación con adultos sin consecuencias fisiológicas relevantes (Andrew *et al*, 1988, 1987). Resultados previos sugieren que los niveles más bajos de antitrombina en ratones recién nacidos se explican principalmente por una reducción de ARNm de este gen en hepatocitos (Teruel *et al*, 2011).

No obstante, también hay evidencias, incluidas las realizadas por nuestro grupo, que han mostrado que las diferencias hemostáticas del desarrollo no son solo cuantitativas y pueden implicar cambios en el contenido del ácido siálico, demostrando que la diferencia no solo depende de los niveles de expresión de proteínas, sino también de MPT (Teruel *et al*, 2013). El perfil electroforético de la antitrombina embrionaria sugiere un menor peso molecular, y los estudios con sialidasa, que uniforman el tamaño de la antitrombina neonatal con la del adulto sugiere que las diferencias cualitativas se deben a una modificación postraducciona: una anormal N-glicosilación que resulta en un reducción significativa del contenido de ácido siálico de la antitrombina neonatal (Teruel *et al*, 2013). Los niveles de ARNm de *St3gal3* y *St3gal4*, dos sialiltransferasas potencialmente implicadas en la sialilación de la antitrombina, fueron un 85% menor en los recién nacidos en comparación con los adultos. Estudios *in silico* de los miRNAs sobreexpresados en neonatos revelaron que mir-200a podría tener como diana estas sialiltransferasas. Por otra parte, estudios *in vitro* en los hepatocitos primarios murinos sostienen que exista este control.

Curiosamente, una sialilación reducida de antitrombina también se ha descrito para la antitrombina en neonatos de pollo y oveja (Amrani *et al*, 1985; Niessen *et al*, 1996),

lo que sugiere que la sialilación es un proceso altamente regulado en las diferentes especies.

2.2.2. Implicaciones patológicas

Las implicaciones patológicas de las MPT en hemostasia también son relevantes. De forma global, se estima que hasta un 5% de las enfermedades asociadas a mutaciones afectan de forma parcial (4%) o completamente (1%) a sitios de MPT (Li et al, 2009). Un ejemplo de ello es la **deficiencia combinada de factores de la coagulación dependientes de vitamina K** (II, VII, IX y X) debida a una alteración en la gamma-carboxilación que produce fundamentalmente trastornos hemorrágicos debido a la incorrecta activación de estos factores (Napolitano *et al*, 2010). Para que estos factores de la coagulación sean proteasas activas y participen en la cascada de la coagulación, necesitan γ -carboxilarse en residuos específicos de ácido glutámico a través de una reacción química en la que participa la vitamina K. Como se ha descrito previamente, en esta MPT intervienen las enzimas γ -glutamyl carboxilasa (GGCX) y la vitamina K epóxido reductasa (VKOR). Esta deficiencia es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones en los genes que codifican estas enzimas; *GGCX* y *VKORC1*, respectivamente. Alteraciones en cualquiera de ambos genes en homocigosis o heterocigosis compuesta pueden llevar a una ineficaz γ -carboxilación.

Sin embargo, no sólo las alteraciones que eliminen MPT o generen nuevas MPT en proteínas del sistema hemostático pueden tener implicaciones patológicas. También alteraciones en la proporción o composición de MPT que experimentan las proteínas de la hemostasia pueden provocar cambios en las características finales de dichas proteínas, alterando el equilibrio del sistema hemostático, con consecuencias patológicas tanto protrombóticas como prohemorrágicas. Como se muestra a

continuación, se han descrito alteraciones en la glicosilación de las plaquetas y de la antitrombina en estados patológicos.

i. Plaquetas

Las alteraciones en la composición de los glicanos de la superficie de las plaquetas y más específicamente la pérdida del ácido siálico terminal se ha relacionado tanto con disminución del recuento de plaquetas (trombopenia) como con alteración de la función plaquetaria (hiperreactividad). A continuación se detallan las implicaciones patológicas más relevantes, congénitas y adquiridas, relacionadas con alteración en la glicosilación de las plaquetas.

a) Enfermedad coronaria y diabetes (hiperreactividad plaquetaria)

El **ácido siálico terminal de la superficie plaquetaria** se ha propuesto en ocasiones como un factor patogénico en la enfermedad coronaria. Un primer estudio caso/control mostró que las plaquetas de pacientes presentaban menos contenido de ácido siálico que las de controles (Mandic *et al*, 2002). Un estudio más reciente, en pacientes con enfermedad coronaria y diabetes mellitus (DM), establece la posible asociación de la alta reactividad plaquetaria y el subsiguiente riesgo de trombosis con cambios en la glicosilación de las plaquetas (Li *et al*, 2018). La superficie de las plaquetas de los pacientes con enfermedad coronaria expresa con intensidad débil β -Gal y ácido siálico con enlace α -2,6 y con intensidad fuerte β -GlcNAc. En las plaquetas de los pacientes con DM tipo 2, las lectinas que se unen a los residuos β -Gal, ácido siálico con enlace α -2,6 y α -manosa se unen mucho menos que en controles, mientras que las que se unen a α 1,6-fucosa y GlcNAc presentan mayor expresión. Además, este mismo

estudio mostró una correlación positiva entre la lectina con especificidad para α -manosa (ConA) y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ activada (PAC-1) en pacientes con DM, mientras que en controles sanos, la correlación fue negativa (Li *et al*, 2018). Estos hallazgos sugieren que las plaquetas con disminución del nivel de sialilación, galactosilación y manosilación, y aumento del nivel de fucosilación y glucosilNAcetilación observadas en pacientes con enfermedad coronaria y DM tipo 2, pueden asociarse a hiperagregabilidad plaquetaria y aumento del riesgo trombótico.

Por otra parte, la secuenciación del exoma completo en la población del estudio Framingham ha identificado unas **variantes en el gen *HYAL2*** que afectan a la agregación plaquetaria (Eicher *et al*, 2017). Las variantes raras en *HYAL2* incluyen una variante missense (N357S) en un sitio conocido de N-glicosilación y una variante nonsense (Q406*) que elimina el anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de la proteína resultante. Estas variantes se asociaron significativamente con una mayor agregación inducida por ADP y por epinefrina. Estas variantes sugieren que el transporte anormal a través de la membrana de *HYAL2* influye en la reactividad plaquetaria (Eicher *et al*, 2017).

b) Almacenamiento *in vitro*

El almacenamiento *in vitro* (senescencia inducida *in vitro*) de plaquetas para transfusión se asocia con cambios en la composición de los glicanos plaquetarios (Jansen *et al*, 2012). Concretamente, las plaquetas pierden el ácido siálico durante su almacenamiento.

Las plaquetas almacenadas en frío y a temperatura ambiente pierden secuencialmente el ácido siálico y posteriormente la galactosa terminal, un proceso que

conduce a la exposición de la β -galactosa y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) subyacentes, respectivamente (Li *et al*, 2016). El frío promueve la agrupación en la superficie de plaquetas de las subunidades GPIb α , GPIb β , GPIX y GPV, un proceso que puede aumentar la densidad de N-glicanos con β -galactosa terminal y β GlcNAc en la subunidad GPIb α , lo que incrementa el aclaramiento de las plaquetas a través del receptor hepático AMR y de la integrina α M β 2 del macrófago hepático (célula de Kupffer), respectivamente (Rumjantseva *et al*, 2009; Hoffmeister *et al*, 2003a; Josefsson *et al*, 2005; Badlou *et al*, 2006). Además, α M β 2 se expresa en la superficie de leucocitos involucrados en el sistema inmune innato. El dominio α M media la inflamación regulando la adhesión y migración de leucocitos; y se ha implicado en varios procesos inmunes tales como fagocitosis, citotoxicidad mediada por células, quimiotaxis y activación celular. Está involucrado en el sistema del complemento debido a su capacidad de unirse al componente 3b del complemento inactivado (iC3b) y la integrina α M β 2 sirve como un receptor fagocítico para el fragmento iC3b del complemento (Xia *et al*, 2002).

c) Sepsis

Durante la **sepsis por neumococo** (*Streptococcus pneumoniae*), el ácido siálico de la superficie de las plaquetas circulantes se elimina por la neuraminidasa A, una sialidasa expresada por el patógeno, quedando expuesta la galactosa como azúcar terminal de los glicanos plaquetarios. El receptor hepático AMR también es en este caso el responsable de la trombopenia durante la infección sistémica por *S. pneumoniae* al eliminar las plaquetas desialiladas de la circulación. La adaptación hemostática por el AMR, con la reducción en los recuentos de plaquetas al inicio de la sepsis protege al

huésped contra el desarrollo de la coagulación intravascular diseminada (Grewal *et al*, 2008, 2013).

d) Trombopenia inmune (PTI)

Estudios recientes en modelos murinos de trombopenia inmune (PTI) han ilustrado otro mecanismo de eliminación de plaquetas a través del AMR. La PTI es un trastorno hemorrágico frecuente causado principalmente por autoanticuerpos plaquetarios que aceleran la destrucción de las plaquetas, alteran la función plaquetaria y/o inhiben la producción de plaquetas (Cines *et al*, 2009). Estos autoanticuerpos se dirigen principalmente contra la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o el complejo GPIb-IX. El modelo predominante postula que la destrucción plaquetaria mediada por anticuerpos ocurre en el bazo (McMillan, 2007), donde la interacción entre la porción Fc de los anticuerpos de inmunoglobulina G asociada a plaquetas y los receptores $\text{Fc}\gamma$ ($\text{Fc}\gamma\text{Rs}$) en los macrófagos inicia la fagocitosis. Sin embargo, los datos muestran que, a diferencia de la PTI mediada por anti- $\alpha\text{IIb}\beta 3$, la PTI mediada por anti-GPIb α frecuentemente es refractaria a las terapias dirigidas a vías de $\text{Fc}\gamma\text{R}$ (por ejemplo, inmunoglobulinas intravenosas) o esplenectomía. Los hallazgos recientes muestran que ciertos anticuerpos anti-GPIb α desencadenan la desialilación de las plaquetas, un proceso que desvía el aclaramiento plaquetario de los receptores Fc del macrófago esplénico al AMR hepático (Li *et al*, 2015). Este apartado se desarrollará más ampliamente en el capítulo II de esta tesis.

e) Macrotrombocitopenia congénita por defecto de sialilación

Las MPT no solo están implicadas en en trombopenias adquiridas. Se ha descrito una macrotrombocitopenia congénita asociada con un defecto de $\alpha 2,3$ -sialilación (Jones

et al, 2011). Se caracteriza por trombopenia grave, sangrado y neutropenia variable. Se confirmó que el defecto de glicosilación estaba restringido a α 2,3-sialilación, pudiendo detectarse en plaquetas, neutrófilos y monocitos. Las plaquetas de este paciente exhibieron una estructura distorsionada del sistema canalicular abierto, lo que indica una producción defectuosa de las plaquetas. Además, la trombopenia en gran parte se justificaba por el rápido aclaramiento a nivel hepático. Sin embargo, no se encontraron mutaciones en las 2,3-sialiltransferasas (ST3-Gal III, IV, VI) ni en el gen para el transportador de ácido siálico CMP (SLC35A1), por lo que no se pudo identificar la causa genética del defecto.

En cambio, la miopatía GNE, que es la miositis hereditaria por cuerpos de inclusión más frecuente, se debe a mutaciones en el gen de una de las enzimas implicadas en la biosíntesis del ácido siálico, la UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa / N-acetilmannosamina quinasa (GNE / MNK) (Eisenberg *et al*, 2001). Se han descrito variantes en el gen *GNE* asociadas a miopatías y trombopenias en relación a una reducción en la biosíntesis de ácido siálico, y en consecuencia un aumento en el aclaramiento plaquetario (Izumi *et al*, 2014; Zhen *et al*, 2014) y más recientemente, también se han descrito variantes en *GNE* asociadas a macrotrombopenias familiares sin clínica muscular (Revel-Vilk *et al*, 2018).

f) Enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario

Por último, la enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario es un trastorno hemorrágico raro, aunque posiblemente infradiagnosticado, autosómico dominante, caracterizado por hiperreactividad plaquetaria (Othman, 2011). Este defecto inherente de la función plaquetaria se debe a una mutación con ganancia de función dentro del

gen *GP1BA* que codifica la GP Ib/IIb. Ciertas mutaciones causan una delección de 9 aminoácidos en el dominio de macroglopéptido de la GPIb, dando como resultado la pérdida de 4 potenciales sitios de O-glicosilación (Othman *et al*, 2005). El defecto da como resultado una interacción plaqueta-FvW excesiva con las consecuencias esperadas: hiperagregación de las plaquetas y un rápido aclaramiento de los agregados de plaquetas-FvW de la circulación, lo que conduce a trombocitopenia y sangrado.

ii. Antitrombina

Dos son los tipos de alteraciones de la glicosilación que se han descrito en la antitrombina con consecuencias patológicas. Por una parte, los defectos congénitos de glicosilación (CDG). Pero también defectos de glicosilación específicos de la antitrombina pueden ocasionarse como consecuencia de mutaciones que reducen o generan sitios de N-glicosilación en esta serpina.

a) Defectos congénitos de glicosilación (CDG)

Desde el descubrimiento de la deficiencia de antitrombina, hace más de 50 años (Egeberg, 1965), pocos son los nuevos factores o mecanismos trombofílicos identificados y todos con menor riesgo trombótico que la propia deficiencia de antitrombina (Martinelli *et al*, 2014). La mayoría de las aproximaciones encaminadas a la búsqueda de nuevas trombofilias se han restringido directa o indirectamente a los genes que codifican alguno de los elementos del sistema hemostático.

Nuestro grupo, en la búsqueda de nuevos mecanismos trombofílicos, identificó un trastorno de una MPT, la N-glicosilación, como importante elemento que incrementa

el riesgo trombótico. El estudio de una serie de 30 pacientes con deficiencia de antitrombina sin alteraciones en el gen que la codifica (*SERPINC1*) identificó un alto porcentaje de casos (27%) en los que se detectaba una forma hipoglicosilada de antitrombina. Este efecto no era específico de la antitrombina, ya que diferentes proteínas hepáticas presentaban aumento de glicoformas con menor contenido de glicanos. En estos pacientes se demostró un desorden de glicosilación congénito con dos posibles manifestaciones, una recesiva (dos mutaciones en genes implicados en la N-glicosilación –Figura 2-) y una dominante transitoria (causado por la combinación de una mutación en un gen de la N-glicosilación y un factor ambiental que también afecta a la glicosilación: el consumo de alcohol) (de la Morena-Barrio *et al*, 2016). La hipoglicosilación en algunas proteínas tiene importantes efectos en los procesos de plegamiento y secreción, como en la antitrombina, lo que provoca que las formas hipoglicosiladas no se secreten al plasma (deficiencia de antitrombina tipo I). Este nuevo mecanismo, que va más allá del gen codificante y que puede ser relativamente frecuente, justifica la deficiencia recesiva y congénito-transitoria de antitrombina y tiene importantes implicaciones diagnósticas y terapéuticas

b) Mutaciones en *SERPINC1* que generan nuevos sitios de N-glicosilación

Se han identificado 6 mutaciones que generan nuevos sitios de glicosilación. La primera variante, **I39N** se aisló en el plasma de un paciente con embolia pulmonar (Brennan *et al*, 1988). La nueva proteína, que representaba el 55% de la antitrombina, tenía una afinidad reducida por la heparina y comprendía dos componentes cuando se analizaba en función de la carga o la masa molecular. El tratamiento con sialidasa y endo-beta-N-acetilglucosaminidasa F sugirió que esta heterogeneidad se debía a una glicosilación parcial que se producía en una nueva secuencia de unión a carbohidratos.

El mapeo de péptidos por HPLC de fase inversa mostró que la anormalidad implicaba al péptido tríptico N-terminal. El análisis de secuencia demostró que la mutación subyacente (I39N) genera una nueva secuencia de glicosilación de Asn-Cys-Thr. Este nuevo sitio de unión de oligosacáridos ocupa la base del dominio de unión a heparina propuesto, lo que explica la reducción consiguiente en la afinidad por la heparina, produciendo una deficiencia de antitrombina tipo II HBS.

La segunda, **R79S**, conocida como **Antitrombina Rouen-II**, genera concentraciones antigénicas normales de antitrombina y actividad inhibidora progresiva normal (Borg *et al*, 1988). Sin embargo, la variante tiene actividades de cofactor de heparina (64-70%) y heparán sulfato (60-68%) disminuidas, y no se activa mediante un pentasacárido sintético que representa la secuencia mínima de heparina. La antitrombina anormal se aisló usando cromatografía de heparina-Sepharosa, y en la electroforesis a pH 8,6 migró más anódica que lo normal, esto es, aparentemente no glicosilada; pero los estudios de la secuencia de aminoácidos demostraron una sustitución de la arginina en el residuo 79 por una serina. Esta mutación crea un nuevo sitio de unión de oligosacáridos en la posición 77, es decir, Asn-Arg-Ser. La evidencia sugiere fuertemente que la arginina 79 es un sitio de unión de heparina principal en la antitrombina y que forma parte de un sitio lineal cargado positivamente (al que se une la heparina) que se extiende a través de la superficie de la molécula de la hélice A a la D. Los dos miembros de la familia donde se encontró esta variante no tenían antecedentes de trombosis venosa. El propositus, un hombre de 40 años, fue estudiado a causa de un infarto agudo de miocardio (sin afectación extensa de las arterias coronarias) y su hija de 13 años presentaba la misma mutación (hasta ese momento sin antecedentes de trombosis) por lo que no se puede descartar que esta deficiencia de antitrombina tipo II

HBS o del dominio de unión a heparina esté implicada en el evento cardiológico (Borg *et al*, 1988).

La tercera, **P439T**, conocida como **Antitrombina Budapest-V** por aislarse en una familia de la capital de Hungría, produce deficiencia de antitrombina tipo II PE (o pleiotrópica) y se asocia a clínica de trombosis severa. De 10 hermanos y 2 hermanas, al menos 2 hermanos fallecieron a causa de embolismo pulmonar a una edad temprana (21 y 16 años). Otros dos niños murieron sin un diagnóstico definitivo (autopsia). Otros cuatro miembros de la familia con deficiencia funcional de antitrombina sufrieron tromboembolismos graves a los 15, 19, 23 y 46 años y sobrevivieron. Sólo tres miembros de la familia (la abuela y dos hermanos) con deficiencia funcional de antitrombina no han desarrollado trombosis. Esta mutación se localiza en el loop s1C-s4B, afectando por tanto a la reactividad como a la afinidad por heparina. Las interacciones defectuosas de esta variante con la trombina pueden ser el resultado de la proximidad de s1C al sitio reactivo. Por el contrario, s1C está espacialmente distante a la superficie cargada positivamente que forma el sitio de unión a la heparina en la antitrombina. La afectación de la afinidad por heparina refleja la vinculación conformacional entre el sitio reactivo y el de unión a la heparina en la molécula (Lane *et al*, 1992). El residuo Prolina 439 también está muy conservado en la superfamilia de serpinas. Nuestro grupo ha identificado un portador de esta mutación y ha comprobado que no genera una forma con un glicano adicional sino que por el contrario, adquiere la conformación latente (de la Morena-Barrio *et al*, 2017). Por ello, pensamos que las consecuencias patológicas no depende de esta MPT sino del cambio conoformacional causado por la mutación missense y que la ausencia de glicosilación pese a generarse una nueva secuencia podría explicarse porque la proteína se pliega en conformación

latente de forma temprana, y esta conformación no permitiría la glicosilación de la s1C (de la Morena-Barrio, comunicación personal, resultados no publicados).

La cuarta **I251T**, afecta a la isoleucina 251, un residuo altamente conservado localizado en el medio de la hebra 3 de la lámina A (s3A). Se inserta completamente con su cadena lateral apuntando al lado interno de la lámina B. En la antitrombina, esta interacción implica I251, F454 y S114, y puede no ser compatible con la sustitución I251T. Además, el cambio I251T crea un nuevo sitio de N-glicosilación NTT. La posibilidad de un glicano en N217, en el medio de la lámina A, es probable que afectara el plegamiento correcto de la proteína, lo que conduciría a la ausencia de proteína variante circulante, explicando así la deficiencia de antitrombina tipo I, que se detecta en portadores. Sin embargo, esta hipótesis no se puede validar ya que no se han llevado a cabo estudios en modelos recombinantes para conocer si realmente se produce glicosilación en el nuevo sitio generado (Picard *et al*, 2000). El trabajo mencionado describe las bases moleculares de la deficiencia de antitrombina en ocho familias. Sin especificar la clínica en cada una de ellas, siete propositus, entre ellos el afecto con la variante **I251T**, habían tenido trombosis graves como trombosis venosa recurrente de las extremidades inferiores y/o trombosis de las venas mesentéricas y/o embolia pulmonar; ocurriendo el primer evento cuando los pacientes tenían entre 20 y 30 años.

La quinta variante publicada **S114N**, que se secreta a una velocidad reducida, posee un quinto sitio de glicosilación adicional como consecuencia de esta mutación (Fitches *et al*, 2001). Fue descrita en un propositus con antecedentes familiares de trombosis venosa. En este caso, se llevaron a cabo estudios de expresión recombinante para confirmar que la glicosilación ligada a Asn se produjo en la nueva secuencia

generada por esta mutación. El modelo recombinante demostró que la proteína variante Asn114 se procesó eficientemente y resultaba glicosilado. La proteína resultante tenía un mayor peso molecular que la antitrombina normal consistente con la adición de una quinta cadena de glicanos. La incubación de la proteína variante con endoglicosidasa H confirmó que el producto de mayor peso molecular había resultado de carbohidratos adicionales. La expresión de la variante Asn114 en células COS-7 dio como resultado la retención intracelular, con un bajo nivel de secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo, consistente con una deficiencia de antitrombina tipo I. La adición de una cadena lateral extra de carbohidrato al residuo 114 de antitrombina puede bloquear el plegamiento postraducciona, atrapando la variante intracelular (Fitches *et al*, 2001).

Por último, nuestro grupo ha identificado una sexta variante que genera un nuevo sitio de glicosilación **I115N**, en una familia con dos afectos, padre e hijo, con clínica de trombosis venosa severa. El padre con trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar agudo y crónico; y el hijo con trombosis venosa profunda a nivel femoral bilateral y trombosis de senos venosos al año de vida. La mutación afecta a un residuo del shutter muy conservado en las serpinas y se asocia con una deficiencia tipo I (no publicada).

c) Mutaciones en *SERPINC1* que eliminan secuencias de N-glicosilación

La única descrita es causada por la mutación **N167T**, y se aisló de un individuo asintomático con deficiencia leve de antitrombina (70%) (Bayston *et al*, 1999). Esta mutación se produce en el codón 167 del gen de la antitrombina, AAC a ACC, dando como resultado una sustitución de un aminoácido, Asn a Thr. Esto altera la secuencia

consenso de N-glicosilación que comienza en Asn167 y por lo tanto impide la glicosilación normal en este sitio. La consecuencia de la mutación es una mayor concentración de β -antitrombina, la fracción de antitrombina que se une con muy alta afinidad a la heparina, lo que podría explicar la ausencia de trombosis en esta familia italiana (Bayston *et al*, 1999).

Nuestro grupo ha identificado una variante que elimina un sitio de N-glicosilación **N224H**, en este caso, en dos familias noruegas con clínica de trombosis venosa severa, responsable de niveles de antitrombina transitoria (Anti-FXa 60-100%) que presentan incremento significativo de una forma con 3 glicanos en plasma (de la Morena-Barrio, resultados preliminares no publicados). El mecanismo patológico de esta alteración todavía está siendo investigado.

2.2.3. Aplicaciones terapéuticas

Las aplicaciones terapéuticas de las MPT en el campo de la hemostasia también se han desarrollado considerablemente.

De forma general, existen dos grupos farmacológicos ampliamente utilizados cuyo mecanismo de acción es inhibir una MPT: anticoagulantes antagonistas de la vitamina K (acenocumarol o warfarina) y los antiagregantes inhibidores de la ciclooxigenasa (ácido acetil salicílico por ejemplo). Los **anticoagulantes cumarínicos** son antagonistas de la vitamina K. La inhibición de una MPT, como es la γ -carboxilación, es el fundamento del principal tratamiento anticoagulante. La acción de estos anticoagulantes es la de inhibir la enzima VKORC1, impidiendo así la reducción de la vitamina K a hidroxiquinona e interrumpiendo el reciclaje necesario de vitamina

K. Sin los residuos de γ -carboxiglutamato sintetizados con la ayuda de la vitamina K, los factores II, VII, IX y X no pueden unirse al calcio divalente, un catión necesario para su activación normal disminuyendo la capacidad coagulante del sistema hemostático (Oldenburg *et al*, 2008). El tratamiento antiagregante con **inhibidores de la COX** es otro ejemplo del beneficio antitrombótico que tienen terapias que afectan a MPT. En las plaquetas, el ácido araquidónico liberado de la membrana por la fosfolipasa A2 sufre la acción de la COX, dando lugar a la formación de tromboxano A2 (TxA2), un potente agonista plaquetario. Por el contrario, en la pared vascular se genera prostaciclina, que actúa como antiagregante plaquetario. La inhibición farmacológica de la COX altera el equilibrio entre ambos compuestos, predominando la acción antiagregante. Entre los fármacos que inhiben esta enzima se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos, destacando entre ellos el ácido acetilsalicílico, la sulfonpirazona, el triflusal y el ditazol. La acción antiplaquetaria del ácido acetilsalicílico se atribuye principalmente a la inhibición irreversible de la actividad de la COX por acetilación del grupo hidroxilo-serina de dicha enzima (Roth *et al*, 1975). De esta forma, se interrumpe la transformación del ácido araquidónico en sus derivados ciclooxigenados, reduciéndose la producción de TxA2 y, subsiguientemente, los procesos fisiopatológicos en los que éstos están implicados.

Si atendemos de forma específica a la glicosilación, cabe destacar los estudios llevados a cabo para optimizar la eficacia de proteínas de uso terapéutico. Durante su desarrollo y administración, los medicamentos basados en proteínas muestran habitualmente eficacias terapéuticas subóptimas debido a sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas. Estas pobres propiedades innatas han impulsado el desarrollo de estrategias a nivel molecular para mejorar el uso terapéutico de los fármacos proteicos. Los diferentes parámetros de glicosilación (el número de glicanos

unidos, el tamaño molecular del glicano, la secuencia y carga) pueden modular las propiedades farmacológicas de los fármacos proteicos en diferentes grados (Solá & Griebenow, 2010). Mientras que la aplicación farmacéutica de la glicosilación todavía sufre algunos desafíos técnicos debido a la naturaleza intrínsecamente compleja de las estructuras de glicanos y las dificultades relacionadas con la producción de glicoproteínas en sistemas de expresión de hospedadores (bajos rendimientos de expresión de glicoproteínas, macro y microheterogeneidad estructural de glicanos), los avances adicionales en la comprensión de las estrategias de remodelación de glicanos basadas en enzimas y químicos, permitirán el diseño racional de las estructuras de glicoproteínas dirigidas. La glicoingeniería ha demostrado que proporciona simultáneamente mejoras sobre la mayoría de los parámetros necesarios para la optimización de la eficacia *in vivo* del fármaco proteico (estabilidad molecular *in vitro* e *in vivo*, respuestas farmacodinámicas y perfiles farmacocinéticos) al tiempo que se dirige al sitio de acción deseado (Solá & Griebenow, 2010). Por último, se describen de manera específica las alteraciones en glicosilación con aplicaciones terapéuticas a nivel de plaquetas y de antitrombina.

i. Plaquetas

La transfusión de plaquetas es una terapia ampliamente utilizada para tratar pacientes con trombocitopenia. Antes de la transfusión, las plaquetas obtenidas de donantes sanos, son mezcladas en bolsas de plástico permeables al gas con plasma del donante (a una concentración aproximada de 3×10^{11} plaquetas en 300 ml) y almacenadas bajo agitación constante a temperatura ambiente durante hasta 5 días (7 días si se llevan a cabo técnicas de inactivación) (Quach *et al*, 2018). La lesión por

almacenamiento se desarrolla con el tiempo de almacenamiento y su gravedad se correlaciona con un peor rendimiento transfusional y una menor supervivencia de las plaquetas infundidas (Murphy & Gardner, 1971; Holme *et al*, 1998). La vida útil de 5 días se adopta principalmente para reducir el riesgo de crecimiento bacteriano y secundariamente para reducir la lesión de almacenamiento de las plaquetas. El desarrollo de tecnologías de detección e inactivación de patógenos que nos permitan almacenar las plaquetas más de 5 días se ve limitado por la lesión por almacenamiento. Esfuerzos para reducir la lesión por almacenamiento, por ejemplo con inhibidores de caspasa 3 o anandamida que pueden inhibir la apoptosis plaquetaria, pueden ayudar a aumentar la vida útil de las plaquetas más allá de 5 días, pero si su inhibición es suficiente para preservar la viabilidad de las plaquetas almacenadas requiere una investigación adicional (Quach *et al*, 2018). En este trabajo nos centraremos en las estrategias dirigidas a modificar la composición de los glicanos.

a) Transfusión de plaquetas almacenadas a largo plazo

Como se ha mencionado previamente, el almacenamiento *in vitro* de las plaquetas se asocia a cambios de la composición de los glicanos, predominantemente a pérdida de ácido siálico terminal. En este sentido, se ha especulado si la **transfusión de plaquetas almacenadas** a largo plazo, desialiladas, a pesar de ser poco funcionales, podría tener el beneficio de estimular la producción de TPO hepática (Grozovsky *et al*, 2015a). Este pensamiento no sólo se basa en el reciente modelo de regulación de la TPO a través del aclaramiento de plaquetas desialiladas. Karpatkin y colaboradores demostraron hace tiempo que la inyección de plaquetas desialadas por neuraminidasa afectaba a la trombopoyesis en conejos, aumentando la producción de plaquetas a través

de los megacariocitos (Karparkin & Shulman, 1980).

b) Estrategias para mejorar el rendimiento transfusional tras el almacenamiento de las plaquetas.

Aunque la galactosilación de residuos de GlcNAc plaquetarios con uridina 59-difosfogalactosa (UDP-galactosa) normaliza la supervivencia de plaquetas de ratón aisladas refrigeradas a corto plazo (Hoffmeister *et al*, 2003b), el tratamiento no evitó la eliminación de las plaquetas de aféresis autólogas transfundidas almacenadas durante 48 horas a 4° C en un estudio de fase 1 (Wandall *et al*, 2008). De acuerdo con el estudio de plaquetas humanas, el tratamiento con uridina 59-difosfogalactosa de plaquetas murinas almacenadas durante 48 horas a 4° C tampoco evitó su rápida eliminación, lo que demuestra que existen diferentes mecanismos de aclaramiento para las plaquetas almacenadas en frío a corto y largo plazo. Es probable que las plaquetas galactosiladas transfundidas, sin sialilación posterior, se eliminen mediante el AMR hepático.

Curiosamente, la incubación de plaquetas con el inhibidor de sialidasa, ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico (DANA), mejora su recuperación y la supervivencia en ratones tras ser almacenadas a 4° C (Jansen *et al*, 2012). Del mismo modo, asialofetuin, un inhibidor de AMR, bloquea significativamente la eliminación rápida de plaquetas refrigeradas (Rumjantseva *et al*, 2009). Se requieren estudios clínicos para determinar si la prevención de la desialilación plaquetaria mediante la inhibición de las sialidasas plaquetarias (Neu1 y Neu3) con ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico mejora el rendimiento transfusional.

Por otro lado, la refrigeración induce la unión del FvW plasmático a GPIb α ,

aumentando el aclaramiento de las plaquetas a través del receptor hepático AMR y de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ del macrófago (célula de Kupffer), como se ha descrito previamente. El tratamiento con O-sialoglicoproteína endopeptidasa, que escinde el dominio de unión del ligando de GPIb α , podría excluir la interacción FvW-GPIb α y la internalización subsiguiente de GPIb α en plaquetas refrigeradas, permitiendo así la refrigeración de plaquetas para su posterior transfusión (Chen *et al*, 2017).

c) Transfusión de plaquetas refrigeradas

La evidencia clínica y de laboratorio sugiere que las plaquetas almacenadas en frío pueden ser preferibles a las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente para el sangrado activo. Además del menor riesgo de contaminación bacteriana, los efectos del almacenamiento refrigerado en las plaquetas incluyen la polimerización de la actina, el desmontaje de los microtúbulos, el aumento del calcio citosólico y el cambio de la forma de la plaqueta (Hoffmeister *et al*, 2001). A pesar de los cambios en la forma, los estudios muestran mejoría en la agregación, adherencia y en la fuerza del coágulo con plaquetas almacenadas a 4°C en comparación a las almacenadas a 22°C (Babic *et al*, 2007; Choi & Pai, 2003). Las aféresis de plaquetas almacenadas a 4°C mantienen características metabólicas más viables, son hemostáticamente más efectivas y liberan menos mediadores proinflamatorios que las aféresis de plaquetas almacenadas a temperatura ambiente durante 5 días (Reddoch *et al*, 2014). Las plaquetas almacenadas a 4°C están "preparadas" para una contribución rápida en la hemostasia tras la transfusión, por lo que parece razonable que las plaquetas refrigeradas sean preferibles para los pacientes con hemorragia activa. El 27 de marzo de 2015, la FDA aprobó la transfusión de plaquetas refrigeradas hasta 3 días sin agitación y el 8 de octubre de

2015, la AABB aprobó la transfusión de plaquetas refrigeradas de hasta 3 días sin agitación para los pacientes con traumatismo y hemorragia activa (Stubbs *et al*, 2017).

Estudios reológicos demuestran que los coágulos formados a partir de plaquetas almacenadas a 4°C durante 5 días son significativamente más rígidos (mayor módulo elástico) y más fuertes (mayor estrés crítico) que los formados a partir de plaquetas almacenadas a temperatura ambiente (Nair *et al*, 2017). El análisis morfológico muestra que las fibras de coágulos de las plaquetas almacenadas en frío eran más densas, delgadas, rectas y con más puntos de ramificación o enlaces cruzados que las de las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente. El estudio muestra que la fuerza mejorada del coágulo y la estructura empaquetada se debe al FXIII plasmático que inducido por el frío, se une a las superficies de las plaquetas, y al consiguiente aumento de la reticulación (Nair *et al*, 2017). El mismo grupo había demostrado un año antes que la superficie de las plaquetas almacenadas en frío contiene GPIIb/IIIa activada, lo que sugiere que el FXIII plasmático probablemente se una directamente a la superficie de la plaqueta y también a través del fibrinógeno (Getz *et al*, 2016). Cabe destacar que la transfusión de plaquetas almacenadas en frío permite la utilización de su máximo potencial hemostático para la respuesta aguda, con una capacidad comparable a la de las plaquetas frescas; asociando un menor riesgo de trombosis tardía debido a la rápida eliminación de las plaquetas almacenadas en frío (Nair *et al*, 2017).

ii. Antitrombina

El tratamiento sustitutivo con antitrombina puede emplearse junto con un tratamiento anticoagulante estándar en determinados casos de deficiencia de antitrombina hereditaria (o más raramente, en deficiencias adquiridas, como por

ejemplo, secundarias al tratamiento con asparaginasa) con tromboembolismos agudos y/o resistencia a heparina. Además, también puede ser oportuno como profilaxis en ciertas situaciones (por ejemplo, en cirugías), aunque este uso está menos estudiado. Los productos disponibles incluyen concentrados de antitrombina derivado del plasma humano combinado (existen diferentes casas que lo comercializan) y una antitrombina humana recombinante producida a partir de la leche de cabras transgénicas (rhAT, ATryn®) (Yeung, 2000), que desarrollaremos brevemente a continuación. Por último, se describe una antitrombina recombinante que combina dos mutaciones, una de ellas eliminando un sitio de N-glicosilación, y que puede comportarse como antídoto de fondaparinux.

1. Antitrombina humana recombinante (ATryn®)

La antitrombina humana recombinante (rhAT, Atryn®) producida en leche de cabra transgénica con pureza superior al 99% fue aprobada por la FDA en 2009 para su uso terapéutico en pacientes con deficiencia de antitrombina congénita (Lavine, 2009). La actividad específica de la rhAT fue idéntica a la antitrombina derivada de plasma humano (phAT) en un ensayo de inhibición de trombina *in vitro*. Sin embargo, la rhAT tenía una afinidad cuatro veces mayor por la heparina que la phAT (Edmunds *et al*, 1998). La rhAT se analizó y se comparó con phAT mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, dicroísmo circular, electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE), secuencia de aminoácidos y mapeo de péptidos con cromatografía líquida/espectrometría de masas. En base a estos análisis, se determinó que la rhAT es estructuralmente idéntica a phAT excepto por las diferencias en la glicosilación. Se encontraron estructuras de oligomanosa en el sitio Asn 155 de la

proteína transgénica, mientras que sólo se observaron estructuras complejas en la proteína plasmática. La rhAT contenía un GalNAc en sustitución a galactosa en algunos oligosacáridos unidos a N, así como un alto grado de fucosilación. Además, la rhAT estaba menos sialilada que phAT y contenía ácido N-acetilneuramínico y ácido N-glicolilneuramínico (Edmunds *et al*, 1998). El aumento de la afinidad por la heparina encontrada en la rhAT resultó de la presencia de estructuras de tipo oligomanosa en el sitio de glicosilación de Asn 155 y de las diferencias en la sialilación, asemejándose a la glicoforma beta de la phAT, pero con cuatro N-glicanos.

Las características farmacocinéticas de la rhAT ya están disponibles en humanos (ATryn, INN-Antithrombin alfa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000587/WC500028260.pdf), destacando que muestra una vida media más corta en comparación con la phAT, concordante con el menor contenido en ácido siálico.

2. AT-N135Q-Pro394

Fondaparinux es un pentasacárido sintético desarrollado a partir de las heparinas de bajo peso molecular, inhibidor del factor Xa. No hay disponibilidad de un antídoto que contrarreste los trastornos hemorrágicos asociados con la sobredosis o pueda ser empleado como agenter reversible en situaciones de riesgo hemorrágico. Con el objetivo de generar un potente antídoto contra derivados de heparina se desarrolló la variante de antitrombina con dos mutaciones AT-N135Q-Pro394. La sustitución de Asn135 por una Gln elimina un sitio de glicosilación y aumenta la afinidad por heparina y la inserción de una Pro entre Arg393 y Ser394 elimina completamente la actividad

anticoagulante (Bianchini *et al*, 2011). Se demostró que AT-N135Q-Pro394 revertía la sobredosis de fondaparinux *in vitro* de manera dosis-dependiente a través de un proceso competitivo con la antitrombina plasmática por la unión a fondaparinux. Este efecto como antídoto también se observó *in vivo*: la administración AT-N135Q-Pro394 (en concentraciones 2.5 veces mayores que la de la antitrombina plasmática), neutralizó el 86% de la actividad anti-Xa a los 5 minutos en ratones tratados con fondaparinux (Bianchini *et al*, 2011).

3. Referencias

- Aly, A.M., Higuchi, M., Kasper, C.K., Kazazian, H.H., Antonarakis, S.E. & Hoyer, L.W. (1992) Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 4933–7.
- Amrani, D.L., Mosesson, M.W. & Koide, T. (1985) Evidence that chicken antithrombin III is a developmentally regulated glycoprotein synthesized by hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta*, **847**, 324–34.
- Andrew, M., Paes, B., Milner, R., Johnston, M., Mitchell, L., Tollefsen, D.M., Castle, V. & Powers, P. (1988) Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood*, **72**, 1651–7.
- Andrew, M., Paes, B., Milner, R., Johnston, M., Mitchell, L., Tollefsen, D.M. & Powers, P. (1987) Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood*, **70**, 165–72.
- Babic, A.M., Josefsson, E.C., Bergmeier, W., Wagner, D.D., Kaufman, R.M., Silberstein, L.E., Stossel, T.P., Hartwig, J.H. & Hoffmeister, K.M. (2007) In vitro function and phagocytosis of galactosylated platelet concentrates after long-term refrigeration. *Transfusion*, **47**, 442–451.
- Badlou, B.A., Spierenburg, G., Ulrichs, H., Deckmyn, H., Smid, W.M. & Akkerman, J.-W.N. (2006) Role of glycoprotein Ib α in phagocytosis of platelets by macrophages. *Transfusion*, **46**, 2090–9.
- Balduini, A., Pallotta, I., Malara, A., Lova, P., Pecci, A., Viarengo, G., Balduini, C.L. & Torti, M. (2008) Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA

- orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **6**, 1900–7.
- Ballmaier, M., Germeshausen, M., Schulze, H., Cherkaoui, K., Lang, S., Gaudig, A., Krukemeier, S., Eilers, M., Strauss, G. & Welte, K. (2001) c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*, **97**, 139–46.
- Ballmaier, M., Schulze, H., Strauss, G., Cherkaoui, K., Wittner, N., Lynen, S., Wolters, S., Bogenberger, J. & Welte, K. (1997) Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin. *Blood*, **90**, 612–9.
- Bandyopadhyay, P.K. (2008) Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitamins and hormones*, **78**, 157–84.
- Bayston, T.A., Tripodi, A., Mannucci, P.M., Thompson, E., Ireland, H., Fitches, A.C., Hananeia, L., Olds, R.J. & Lane, D.A. (1999) Familial overexpression of beta antithrombin caused by an Asn135Thr substitution. *Blood*, **93**, 4242–7.
- Bender, M., Giannini, S., Grozovsky, R., Jönsson, T., Christensen, H., Pluthero, F.G., Ko, A., Mullally, A., Kahr, W.H.A., Hoffmeister, K.M. & Falet, H. (2015) Dynamin 2-dependent endocytosis is required for normal megakaryocyte development in mice. *Blood*, **125**, 1014–24.
- Bertina, R.M., Ploos van Amstel, H.K., van Wijngaarden, A., Coenen, J., Leemhuis, M.P., Deutz-Terlouw, P.P., van der Linden, I.K. & Reitsma, P.H. (1990) Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. *Blood*, **76**, 538–48.
- Bharadwaj, D., Harris, R.J., Kisiel, W. & Smith, K.J. (1995) Enzymatic removal of

sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 6537–42.

Bianchini, E.P., Fazavana, J., Picard, V. & Borgel, D. (2011) Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives. *Blood*, **117**, 2054–60.

Borg, J.Y., Owen, M.C., Soria, C., Soria, J., Caen, J. & Carrell, R.W. (1988) Proposed heparin binding site in antithrombin based on arginine 47. A new variant Rouen-II, 47 Arg to Ser. *The Journal of clinical investigation*, **81**, 1292–6.

Boyer, R. (2006) Posttranslational modification of proteins: Expanding nature’s inventory. Christopher T. Walsh, Roberts & Company Publishers, Greenwood Village, CO, 2005, 576 pp., ISBN 0-9747077-3-2, \$98.00. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **34**, 461–462.

Brennan, S.O., Borg, J.Y., George, P.M., Soria, C., Soria, J., Caen, J. & Carrell, R.W. (1988) New carbohydrate site in mutant antithrombin (7 Ile----Asn) with decreased heparin affinity. *FEBS letters*, **237**, 118–22.

Brittan, J.L., Buckeridge, T.J., Finn, A., Kadioglu, A. & Jenkinson, H.F. (2012) Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular oral microbiology*, **27**, 270–83.

Caspers, M., Pavlova, A., Driesen, J., Harbrecht, U., Klamroth, R., Kadar, J., Fischer, R., Matthes, B. & Oldenburg, J. (2012) Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – Practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thrombosis and Haemostasis*, **108**, 247–257.

Chen, J., Moloney, D.J. & Stanley, P. (2001) Fringe modulation of Jagged1-induced

- Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 13716–21.
- Chen, W., Druzak, S.A., Wang, Y., Josephson, C.D., Hoffmeister, K.M., Ware, J. & Li, R. (2017) Refrigeration-Induced Binding of von Willebrand Factor Facilitates Fast Clearance of Refrigerated Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **37**, 2271–2279.
- Choi, J.W. & Pai, S.H. (2003) Influence of storage temperature on the responsiveness of human platelets to agonists. *Annals of clinical and laboratory science*, **33**, 79–85.
- Ciechanover, A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**, 79–87.
- Cines, D.B., Bussel, J.B., Liebman, H.A. & Luning Prak, E.T. (2009) The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, **113**, 6511–21.
- Cohen-Solal, K., Villeval, J.L., Titeux, M., Lok, S., Vainchenker, W. & Wendling, F. (1996) Constitutive expression of Mpl ligand transcripts during thrombocytopenia or thrombocytosis. *Blood*, **88**, 2578–84.
- Crocker, P.R. & Varki, A. (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends in immunology*, **22**, 337–42.
- Crook, M. (1990) Platelet sialic Acid and its significance to platelet life-spans. *Platelets*, **1**, 167.
- Crook, M. (1991) Sialic Acid: its importance to platelet function in health and disease. *Platelets*, **2**, 1–10.

- Cunningham, M.A., Pipe, S.W., Zhang, B., Hauri, H.-P., Ginsburg, D. & Kaufman, R.J. (2003) LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **1**, 2360–7.
- Davie, E.W. (2003) A Brief Historical Review of the Waterfall/Cascade of Blood Coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 50819–50832.
- Deribe, Y.L., Pawson, T. & Dikic, I. (2010) Post-translational modifications in signal integration. *Nature structural & molecular biology*, **17**, 666–72.
- Drakenberg, T., Fernlund, P., Roepstorff, P. & Stenflo, J. (1983) beta-Hydroxyaspartic acid in vitamin K-dependent protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 1802–6.
- Edmunds, T., Van Patten, S.M., Pollock, J., Hanson, E., Bernasconi, R., Higgins, E., Manavalan, P., Ziomek, C., Meade, H., McPherson, J.M. & Cole, E.S. (1998) Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, **91**, 4561–71.
- Egeberg, O. (1965) Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*, **13**, 516–30.
- Eicher, J.D., Chen, M.-H., Pitsillides, A.N., Lin, H., Veeraraghavan, N., Brody, J.A., Metcalf, G.A., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Becker, D.M., Becker, L.C., Faraday, N., Mathias, R.A., Yanek, L.R., Boerwinkle, E., Cupples, L.A. & Johnson, A.D. (2017) Whole exome sequencing in the Framingham Heart Study identifies rare variation in HYAL2 that influences platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis*, **117**, 1083–1092.
- Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmilevich, I., Friedmann,

- A., Karpati, G., Bradley, W.G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E.B., Beckmann, J.S., Argov, Z. & Mitrani-Rosenbaum, S. (2001) The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nature genetics*, **29**, 83–7
- Fernández-Morán, H., Marchalonis, J.J. & Edelman, G.M. (1968) Electron microscopy of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *Journal of molecular biology*, **32**, 467–9.
- Fernández, J.A., Hackeng, T.M., Kojima, K. & Griffin, J.H. (1997) The carbohydrate moiety of factor V modulates inactivation by activated protein C. *Blood*, **89**, 4348–54.
- Fielder, P.J., Gurney, A.L., Stefanich, E., Marian, M., Moore, M.W., Carver-Moore, K. & de Sauvage, F.J. (1996) Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood*, **87**, 2154–61.
- Fitches, A.C., Lewandowski, K. & Olds, R.J. (2001) Creation of an additional glycosylation site as a mechanism for type I antithrombin deficiency. *Thrombosis and haemostasis*, **86**, 1023–7.
- Frebelius, S., Isaksson, S. & Swedenborg, J. (1996) Thrombin inhibition by antithrombin III on the subendothelium is explained by the isoform AT beta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **16**, 1292–7.
- George, J.N. (2000) Platelets. *The Lancet*, **355**, 1531–1539.
- Getz, T.M., Montgomery, R.K., Bynum, J.A., Aden, J.K., Pidcoke, H.F. & Cap, A.P. (2016) Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*, **56**, 1320–8.

Giannini, S., Lee-Sundlov, M.M., Adelman, M., Jurak Begonja, A., Lau, J.T., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2017) β 1,4-Galactosyltransferase 1 Is a Key Regulator of Thrombopoiesis. *Blood*, **130**:1018 (Abstract 59th ASH)

Gibbins, J.M. (2004) Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *Journal of cell science*, **117**, 3415–25.

Giri, T.K., Linse, S., de Frutos, P.G., Yamazaki, T., Villoutreix, B.O. & Dahlbäck, B. (2002) Structural Requirements of Anticoagulant Protein S for Its Binding to the Complement Regulator C4b-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 15099–15106.

Giri, T.K., Yamazaki, T., Sala, N., Dahlbäck, B. & de Frutos, P.G. (2000) Deficient APC-cofactor activity of protein S Heerlen in degradation of factor Va Leiden: a possible mechanism of synergism between thrombophilic risk factors. *Blood*, **96**, 523–31.

Greenaway, P.J. & LeVine, D. (1973) Binding of N-acetyl-neuraminic acid by wheat-germ agglutinin. *Nature: New biology*, **241**, 191–2.

Grewal, P.K., Aziz, P. V, Uchiyama, S., Rubio, G.R., Lardone, R.D., Le, D., Varki, N.M., Nizet, V. & Marth, J.D. (2013) Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 20218–23.

Grewal, P.K., Uchiyama, S., Ditto, D., Varki, N., Le, D.T., Nizet, V. & Marth, J.D. (2008) The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nature medicine*, **14**, 648–55.

Grinnell, B.W., Walls, J.D. & Gerlitz, B. (1991) Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by

- thrombin. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 9778–85.
- Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2015a) The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nature medicine*, **21**, 47–54.
- Grozovsky, R., Giannini, S., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2015b) Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood*, **126**, 1877–84.
- Gu, J., Lu, L., Xu, R. & Chen, X. (2002) Plasma thrombopoietin levels in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Chinese medical journal*, **115**, 983–6.
- Hansson, K. & Stenflo, J. (2005) Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **3**, 2633–48.
- Higuchi, M., Wong, C., Kochhan, L., Olek, K., Aronis, S., Kasper, C.K., Kazazian, H.H. & Antonarakis, S.E. (1990) Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics*, **6**, 65–71.
- Hodohara, K., Fujii, N., Yamamoto, N. & Kaushansky, K. (2000) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood*, **95**, 769–75.
- Hoffmeister, K.M. (2011) The role of lectins and glycans in platelet clearance. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **9 Suppl 1**, 35–43.
- Hoffmeister, K.M., Falet, H., Toker, A., Barkalow, K.L., Stossel, T.P. & Hartwig, J.H. (2001) Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. *The Journal of*

biological chemistry, **276**, 24751–9.

Hoffmeister, K.M., Felbinger, T.W., Falet, H., Denis, C. V, Bergmeier, W., Mayadas, T.N., von Andrian, U.H., Wagner, D.D., Stossel, T.P. & Hartwig, J.H. (2003a) The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*, **112**, 87–97.

Hoffmeister, K.M., Josefsson, E.C., Isaac, N.A., Clausen, H., Hartwig, J.H. & Stossel, T.P. (2003b) Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 1531–4.

Holme, S., Moroff, G. & Murphy, S. (1998) A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, **38**, 31–40.

Hunter, T. (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology*, **21**, 140–6.

Huntington, J.A., McCoy, A., Belzar, K.J., Pei, X.Y., Gettins, P.G. & Carrell, R.W. (2000a) The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 15377–83.

Huntington, J.A., Read, R.J. & Carrell, R.W. (2000b) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **407**, 923–926.

Ishiguro, K., Kojima, T., Kadomatsu, K., Nakayama, Y., Takagi, A., Suzuki, M., Takeda, N., Ito, M., Yamamoto, K., Matsushita, T., Kusugami, K., Muramatsu, T. & Saito, H. (2000) Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *The Journal of clinical investigation*, **106**, 873–8.

Izumi, R., Niihori, T., Suzuki, N., Sasahara, Y., Rikiishi, T., Nishiyama, A.,

- Nishiyama, S., Endo, K., Kato, M., Warita, H., Konno, H., Takahashi, T., Tateyama, M., Nagashima, T., Funayama, R., Nakayama, K., Kure, S., Matsubara, Y., Aoki, Y. & Aoki, M. (2014) GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscular disorders : NMD*, **24**, 1068–72
- Janik, M.E., Lityńska, A. & Vereecken, P. (2010) Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochimica et biophysica acta*, **1800**, 545–55.
- Jansen, A.J.G., Josefsson, E.C., Rumjantseva, V., Liu, Q.P., Falet, H., Bergmeier, W., Cifuni, S.M., Sackstein, R., von Andrian, U.H., Wagner, D.D., Hartwig, J.H. & Hoffmeister, K.M. (2012) Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood*, **119**, 1263–73.
- Jensen, O.N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **7**, 391–403.
- Johnston, J.W., Coussens, N.P., Allen, S., Houtman, J.C.D., Turner, K.H., Zaleski, A., Ramaswamy, S., Gibson, B.W. & Apicella, M.A. (2008) Characterization of the N-acetyl-5-neuraminic acid-binding site of the extracytoplasmic solute receptor (SiaP) of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 855–65.
- Jones, C., Denecke, J., Sträter, R., Stölting, T., Schunicht, Y., Zeuschner, D., Klumperman, J., Lefeber, D.J., Spelten, O., Zarbock, A., Kelm, S., Strenge, K., Haslam, S.M., Lühn, K., Stahl, D., Gentile, L., Schreiter, T., Hilgard, P., Beck-Sickinger, A.G., Marquardt, T., et al (2011) A novel type of macrothrombocytopenia associated with a defect in α 2,3-sialylation. *The*

American journal of pathology, **179**, 1969–77.

Josefsson, E.C., Gebhard, H.H., Stossel, T.P., Hartwig, J.H. & Hoffmeister, K.M.

(2005) The macrophage alphaMbeta2 integrin alphaM lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 18025–32.

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D.,

Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A. & von Andrian, U.H. (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science (New York, N.Y.)*, **317**, 1767–70.

Kalafatis, M. (1998) Identification and Partial Characterization of Factor Va Heavy

Chain Kinase from Human Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 8459–8466.

Karpatkin, S. & Shulman, S. (1980) Asialo platelets enhance thrombopoiesis.

Transactions of the Association of American Physicians, **93**, 244–50.

Kaser, A., Brandacher, G., Steurer, W., Kaser, S., Offner, F.A., Zoller, H., Theurl, I.,

Widder, W., Molnar, C., Ludwiczek, O., Atkins, M.B., Mier, J.W. & Tilg, H. (2001) Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, **98**, 2720–5.

Kaushansky, K. (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The*

Journal of clinical investigation, **115**, 3339–47.

Kaushansky, K. (2009) Determinants of platelet number and regulation of

thrombopoiesis. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2009**, 147–52.

de la Morena-Barrio, M., Sandoval, E., Llamas, P., Wypasek, E., Toderici, M.,

- Navarro-Fernández, J., Rodríguez-Alen, A., Revilla, N., López-Gálvez, R., Miñano, A., Padilla, J., de la Morena-Barrio, B., Cuesta, J., Corral, J. & Vicente, V. (2017) High levels of latent antithrombin in plasma from patients with antithrombin deficiency. *Thrombosis and haemostasis*, **117**, 880–888.
- de la Morena-Barrio, M.E., Martínez-Martínez, I., de Cos, C., Wypasek, E., Roldán, V., Undas, A., van Scherpenzeel, M., Lefeber, D.J., Toderici, M., Sevivas, T., España, F., Jaeken, J., Corral, J. & Vicente, V. (2016) Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **14**, 1549–60.
- Lane, D.A., Bayston, T., Olds, R.J., Fitches, A.C., Cooper, D.N., Millar, D.S., Jochmans, K., Perry, D.J., Okajima, K., Thein, S.L. & Emmerich, J. (1997) Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, **77**, 197–211.
- Lane, D.A., Olds, R.J., Conard, J., Boisclair, M., Bock, S.C., Hultin, M., Abildgaard, U., Ireland, H., Thompson, E. & Sas, G. (1992) Pleiotropic effects of antithrombin strand 1C substitution mutations. *The Journal of clinical investigation*, **90**, 2422–33.
- Lavine, G. (2009) FDA approves first biological product derived from transgenic animal. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **66**, 518–518.
- Leyte, A., van Schijndel, H.B., Niehrs, C., Huttner, W.B., Verbeet, M.P., Mertens, K. & van Mourik, J.A. (1991) Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand

- factor. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 740–6.
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M. & Ni, H. (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nature communications*, **6**, 7737.
- Li, L., Qu, C., Wu, X., Dai, J., Lu, Y., Gong, Y., You, R. & Liu, Y. (2018) Patterns and levels of platelet glycosylation in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, **45**, 56–65.
- Li, R., Hoffmeister, K.M. & Falet, H. (2016) Glycans and the platelet life cycle. *Platelets*, **27**, 505–11.
- Li, S., Iakoucheva, L.M., Mooney, S.D. & Radivojac, P. (2010) Loss of post-translational modification sites in disease. *Pac Symp Biocomput*, pp 337–347.
- Li, Y. & Chen, X. (2012) Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, **94**, 887–905.
- Lu, D., Xie, R.L., Rydzewski, A. & Long, G.L. (1997) The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S. *Thrombosis and haemostasis*, **77**, 1156–63.
- Lundblad, A. (2015) Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Upsala journal of medical sciences*, **120**, 104–12.
- Luxembourg, B., Delev, D., Geisen, C., Spannagl, M., Krause, M., Miesbach, W., Heller, C., Bergmann, F., Schmeink, U., Grossmann, R., Lindhoff-Last, E., Seifried, E., Oldenburg, J. & Pavlova, A. (2011) Molecular basis of

- antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*, **105**, 635–646.
- Manchee, R.J. & Taylor-Robinson, D. (1969) Utilization of neuraminic acid receptors by mycoplasmas. *Journal of bacteriology*, **98**, 914–9.
- Mandic, R., Opper, C., Krappe, J. & Wesemann, W. (2002) Platelet sialic acid as a potential pathogenic factor in coronary heart disease. *Thrombosis research*, **106**, 137–41.
- Martin, D.M., Boys, C.W. & Ruf, W. (1995) Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**, 852–9.
- Martinelli, I., De Stefano, V. & Mannucci, P.M. (2014) Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nature reviews. Cardiology*, **11**, 140–56.
- McCarty, J.M., Sprugel, K.H., Fox, N.E., Sabath, D.E. & Kaushansky, K. (1995) Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood*, **86**, 3668–75.
- McMillan, R. (2007) The Pathogenesis of Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. *Seminars in Hematology*, **44**, S3–S11.
- Meyer, S.C., Keller, M.D., Woods, B.A., LaFave, L.M., Bastian, L., Kleppe, M., Bhagwat, N., Marubayashi, S. & Levine, R.L. (2014) Genetic studies reveal an unexpected negative regulatory role for Jak2 in thrombopoiesis. *Blood*, **124**, 2280–4.
- Michnick, D.A., Pittman, D.D., Wise, R.J. & Kaufman, R.J. (1994) Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 20095–102.

- Di Minno, M.N.D., Ambrosino, P., Ageno, W., Rosendaal, F., Di Minno, G. & Dentali, F. (2015) Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thromboembolism: a meta-analysis of observational studies. *Thrombosis research*, **135**, 923–32.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S. & Vogt, T.F. (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*, **406**, 369–375.
- Monti, E., Bassi, M.T., Bresciani, R., Civini, S., Croci, G.L., Papini, N., Riboni, M., Zanchetti, G., Ballabio, A., Preti, A., Tettamanti, G., Venerando, B. & Borsani, G. (2004) Molecular cloning and characterization of NEU4, the fourth member of the human sialidase gene family. *Genomics*, **83**, 445–53.
- Monti, E. & Miyagi, T. (2012) Structure and Function of Mammalian Sialidases. In *Topics in current chemistry* pp 183–208.
- Monti, E., Preti, A., Rossi, E., Ballabio, A. & Borsani, G. (1999) Cloning and characterization of NEU2, a human gene homologous to rodent soluble sialidases. *Genomics*, **57**, 137–43.
- Mumford, A.D., Laffan, M., O'Donnell, J., McVey, J.H., Johnson, D.J.D., Manning, R.A. & Kemball-Cook, G. (2002) A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *British journal of haematology*, **118**, 589–94.
- Mumford, A.D., McVey, J.H., Morse, C. V., Gomez, K., Steen, M., Norstrom, E.A., Tuddenham, E.G.D., Dahlback, B. & Bolton-Maggs, P.H.B. (2003) Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *British Journal of Haematology*, **123**, 496–501.

- Murphy, S. & Gardner, F.H. (1971) Platelet storage at 22 degrees C; metabolic, morphologic, and functional studies. *The Journal of clinical investigation*, **50**, 370–7.
- Nair, P.M., Pandya, S.G., Dallo, S.F., Reddoch, K.M., Montgomery, R.K., Pidcoke, H.F., Cap, A.P. & Ramasubramanian, A.K. (2017) Platelets stored at 4°C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking. *British journal of haematology*, **178**, 119–129.
- Napolitano, M., Mariani, G. & Lapecorella, M. (2010) Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors. *Orphanet journal of rare diseases*, **5**, 21.
- Nardy, A.F.F.R., Freire-de-Lima, C.G., Pérez, A.R. & Morrot, A. (2016) Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in microbiology*, **7**, 348.
- Nedelkov, D., Kiernan, U.A., Niederkofler, E.E., Tubbs, K.A. & Nelson, R.W. (2005) Investigating diversity in human plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 10852–7.
- Ng, A.P., Kauppi, M., Metcalf, D., Hyland, C.D., Josefsson, E.C., Lebois, M., Zhang, J.-G., Baldwin, T.M., Di Rago, L., Hilton, D.J. & Alexander, W.S. (2014) Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 5884–9.
- Niessen, R.W., Lamping, R.J., Peters, M., Lamers, W.H. & Sturk, A. (1996) Fetal and neonatal development of antithrombin III plasma activity and liver messenger RNA levels in sheep. *Pediatric research*, **39**, 685–91.

- North, R.A., Horne, C.R., Davies, J.S., Remus, D.M., Muscroft-Taylor, A.C., Goyal, P., Wahlgren, W.Y., Ramaswamy, S., Friemann, R. & Dobson, R.C.J. (2017) “Just a spoonful of sugar...”: import of sialic acid across bacterial cell membranes. *Biophysical Reviews*.
- Nowak, A.A., O’Brien, H.E.R., Henne, P., Doerr, A., Vanhoorelbeke, K., Laffan, M.A. & McKinnon, T.A.J. (2017) ADAMTS-13 glycans and conformation-dependent activity. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **15**, 1155–1166.
- Nurden, A.T. (2014) Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **40**, 577–84.
- Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C. & Watzka, M. (2008) The vitamin K cycle. *Vitamins and hormones*, **78**, 35–62.
- Olson, S.T., Frances-Chmura, A.M., Swanson, R., Björk, I. & Zettlmeissl, G. (1997) Effect of Individual Carbohydrate Chains of Recombinant Antithrombin on Heparin Affinity and on the Generation of Glycoforms Differing in Heparin Affinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **341**, 212–221.
- Othman, M. (2011) Platelet-type von Willebrand disease: a rare, often misdiagnosed and underdiagnosed bleeding disorder. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **37**, 464–9.
- Othman, M., Notley, C., Lavender, F.L., White, H., Byrne, C.D., Lillicrap, D. & O’Shaughnessy, D.F. (2005) Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood*, **105**, 4330–4336.
- Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M. & Belzer, C. (2013) Glycobiome: bacteria and mucus

at the epithelial interface. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, **27**, 25–38.

Picard, V., Bura, A., Emmerich, J., Alhenc-Gelas, M., Biron, C., Houbouyan-Reveillard, L.L., Molho, P., Labatide-Alanore, A., Sié, P., Toulon, P., Verdy, E. & Aiach, M. (2000) Molecular bases of antithrombin deficiency in French families: identification of seven novel mutations in the antithrombin gene. *British journal of haematology*, **110**, 731–4.

Pipe, S.W., Morris, J.A., Shah, J. & Kaufman, R.J. (1998) Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 8537–44.

Pittman, D.D., Tomkinson, K.N. & Kaufman, R.J. (1994a) Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 17329–37.

Pittman, D.D., Tomkinson, K.N., Michnick, D., Selighsohn, U. & Kaufman, R.J. (1994b) Posttranslational sulfation of factor V is required for efficient thrombin cleavage and activation and for full procoagulant activity. *Biochemistry*, **33**, 6952–9.

Pshezhetsky, A. V, Richard, C., Michaud, L., Igdoura, S., Wang, S., Elsliger, M.A., Qu, J., Leclerc, D., Gravel, R., Dallaire, L. & Potier, M. (1997) Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nature genetics*, **15**, 316–20.

Quach, M.E., Chen, W. & Li, R. (2018) Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood*, **131**, 1512–1521.

Reddoch, K.M., Pidcoke, H.F., Montgomery, R.K., Fedyk, C.G., Aden, J.K.,

- Ramasubramanian, A.K. & Cap, A.P. (2014) Hemostatic Function of Apheresis Platelets Stored at 4°C and 22°C. *Shock*, **41**, 54–61.
- Reinke, S.O., Lehmer, G., Hinderlich, S. & Reutter, W. (2009) Regulation and pathophysiological implications of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) as the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *Biological chemistry*, **390**, 591–9.
- Revel-Vilk, S., Shai, E., Turro, E., Jahshan, N., Hi-Am, E., Spectre, G., Daum, H., Kalish, Y., Althaus, K., Greinacher, A., Kaplinsky, C., Izraeli, S., Mapeta, R., Deevi, S.V. V, Jarocha, D., Ouwehand, W.H., Downes, K., Poncz, M., Varon, D. & Lambert, M.P. (2018) GNE variants causing autosomal recessive macrothrombocytopenia without associated muscle wasting. *Blood*, **132**, 1851–1854
- Rivera, J., Lozano, M.L., Navarro-Nunez, L. & Vicente, V. (2009) Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*, **94**, 700–711.
- Roth, G.J., Stanford, N. & Majerus, P.W. (1975) Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 3073–6.
- Rudd, P.M. & Dwek, R.A. (1997) Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1–100.
- Rumjantseva, V., Grewal, P.K., Wandall, H.H., Josefsson, E.C., Sørensen, A.L., Larson, G., Marth, J.D., Hartwig, J.H. & Hoffmeister, K.M. (2009) Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nature medicine*, **15**, 1273–80.

- Schrezenmeier, H., Griesshammer, M., Hornkohl, A., Nichol, J.L., Hecht, T., Heimpel, H., Kubanek, B. & Raghavachar, A. (1998) Thrombopoietin serum levels in patients with aplastic anaemia: correlation with platelet count and persistent elevation in remission. *British journal of haematology*, **100**, 571–6.
- Severi, E., Hood, D.W. & Thomas, G.H. (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology (Reading, England)*, **153**, 2817–22.
- Silveira, J.R., Kalafatis, M. & Tracy, P.B. (2002) Carbohydrate moieties on the procofactor factor V, but not the derived cofactor factor Va, regulate its inactivation by activated protein C. *Biochemistry*, **41**, 1672–80.
- Sinha, U. & Wolf, D.L. (1993) Carbohydrate residues modulate the activation of coagulation factor X. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 3048–51.
- Smith, S.A., Travers, R.J. & Morrissey, J.H. (2015) How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **50**, 326–36.
- Solá, R.J. & Griebenow, K. (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, **24**, 9–21.
- Sørensen, A.L., Rumjantseva, V., Nayeb-Hashemi, S., Clausen, H., Hartwig, J.H., Wandall, H.H. & Hoffmeister, K.M. (2009) Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood*, **114**, 1645–54.
- Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12**, 43R–56R.

- Springer, G.F. & Desai, P.R. (1975) Human blood-group MN and precursor specificities: structural and biological aspects. *Carbohydrate research*, **40**, 183–92.
- Steen, M., Norstrøm, E.A., Tholander, A.-L., Bolton-Maggs, P.H.B., Mumford, A., McVey, J.H., Tuddenham, E.G.D. & Dahlbäck, B. (2004) Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood*, **103**, 3381–3387.
- Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P. (1974) Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**, 2730–3.
- Stenflo, J., Lundwall, A. & Dahlbäck, B. (1987) beta-Hydroxyasparagine in domains homologous to the epidermal growth factor precursor in vitamin K-dependent protein S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 368–72.
- Stone, R.L., Nick, A.M., McNeish, I.A., Balkwill, F., Han, H.D., Bottsford-Miller, J., Rupairmoole, R., Armaiz-Pena, G.N., Pecot, C. V, Coward, J., Deavers, M.T., Vasquez, H.G., Urbauer, D., Landen, C.N., Hu, W., Gershenson, H., Matsuo, K., Shahzad, M.M.K., King, E.R., Tekedereli, I., et al (2012) Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, **366**, 610–8.
- Stubbs, J.R., Tran, S.A., Emery, R.L., Hammel, S.A., Haugen, D.A.L., Zielinski, M.D., Zietlow, S.P. & Jenkins, D. (2017) Cold platelets for trauma-associated bleeding: regulatory approval, accreditation approval, and practice implementation-just the “tip of the iceberg”. *Transfusion*, **57**, 2836–

2844.

- Tait, R.C., Walker, I.D., Perry, D.J., Islam, S.I., Daly, M.E., McCall, F., Conkie, J.A. & Carrell, R.W. (1994) Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *British journal of haematology*, **87**, 106–12.
- Tanida, S., Akita, K., Ishida, A., Mori, Y., Toda, M., Inoue, M., Ohta, M., Yashiro, M., Sawada, T., Hirakawa, K. & Nakada, H. (2013) Binding of the sialic acid-binding lectin, Siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of β -catenin and subsequent cell growth. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 31842–52.
- Teruel, R., Corral, J., Pérez-Andreu, V., Martínez-Martínez, I., Vicente, V. & Martínez, C. (2011) Potential role of miRNAs in developmental haemostasis. *PloS one*, **6**, e17648.
- Teruel, R., Martínez-Martínez, I., Guerrero, J.A., González-Conejero, R., de la Morena-Barrio, M.E., Salloum-Asfar, S., Arroyo, A.B., Águila, S., García-Barberá, N., Miñano, A., Vicente, V., Corral, J. & Martínez, C. (2013) Control of post-translational modifications in antithrombin during murine post-natal development by miR-200a. *Journal of biomedical science*, **20**, 29.
- Tong, J., Fu, Y., Wu, N.-H., Rohde, M., Meng, F., Valentin-Weigand, P. & Herrler, G. (2017) Sialic acid-dependent interaction of group B streptococci with influenza virus-infected cells reveals a novel adherence and invasion mechanism. *Cellular microbiology*, e12818.
- Turk, B., Brieditis, I., Bock, S.C., Olson, S.T. & Björk, I. (1997) The Oligosaccharide Side Chain on Asn-135 of α -Antithrombin, Absent in β -Antithrombin, Decreases the Heparin Affinity of the Inhibitor by Affecting the

- Heparin-Induced Conformational Change [†]. *Biochemistry*, **36**, 6682–6691.
- Turko, I. V, Fan, B. & Gettins, P.G. (1993) Carbohydrate isoforms of antithrombin variant N135Q with different heparin affinities. *FEBS letters*, **335**, 9–12.
- Varki, A. & Schauer, R. (2009) Sialic Acids Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wada, T., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., Kuwabara, M., Akita, H. & Miyagi, T. (1999) Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase. *Biochemical and biophysical research communications*, **261**, 21–7.
- Wagner, D.D., Mayadas, T. & Marder, V.J. (1986) Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *The Journal of cell biology*, **102**, 1320–4.
- Wandall, H.H., Hoffmeister, K.M., Sørensen, A.L., Rumjantseva, V., Clausen, H., Hartwig, J.H. & Slichter, S.J. (2008) Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood*, **111**, 3249–56.
- Weiler, H. & Isermann, B.H. (2003) Thrombomodulin. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **1**, 1515–24.
- Witmer, M.R. & Hatton, M.W. (1991) Antithrombin III-beta associates more readily than antithrombin III-alpha with uninjured and de-endothelialized aortic wall in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, **11**, 530–9.
- Wolber, E.M., Fandrey, J., Frackowski, U. & Jelkmann, W. (2001) Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. *Thrombosis and haemostasis*, **86**, 1421–4.
- Wormald, M.R., Petrescu, A.J., Pao, Y.-L., Glithero, A., Elliott, T. & Dwek, R.A.

- (2002) Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chemical reviews*, **102**, 371–86.
- Wu, W. & Suttie, J.W. (1999) N-glycosylation contributes to the intracellular stability of prothrombin precursors in the endoplasmic reticulum. *Thrombosis research*, **96**, 91–8.
- Xia, Y., Borland, G., Huang, J., Mizukami, I.F., Petty, H.R., Todd, R.F. & Ross, G.D. (2002) Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **169**, 6417–26.
- Yang, W.H., Aziz, P. V, Heithoff, D.M., Mahan, M.J., Smith, J.W. & Marth, J.D. (2015) An intrinsic mechanism of secreted protein aging and turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 13657–62.
- Yeung, P.K. (2000) Transgenic antithrombin III (Genzyme). *IDrugs: the investigational drugs journal*, **3**, 669–73.
- Zhen, C., Guo, F., Fang, X., Liu, Y. & Wang, X. (2014) A family with distal myopathy with rimmed vacuoles associated with thrombocytopenia. *Neurological Sciences*, **35**, 1479–1481

Objetivos

Las evidencias que confieren un peso relevante a las MPT en diferentes patologías hematológicas no hacen más que crecer en los últimos años como se ha resumido en la introducción. La glicosilación es una modificación que afecta significativamente la masa y carga de prácticamente la totalidad de las proteínas secretadas y expresadas en la superficie celular. Alteraciones cuantitativas o cualitativas del glicano pueden afectar el plegamiento, secreción y/o la interacción de la proteína afectada (y con ello, las características inmunológicas, la capacidad funcional o el aclaramiento). Recientes estudios muestran la posible relevancia del ácido siálico en diferentes componentes del sistema hemostático, tanto en plaquetas como en coagulación.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es profundizar en este campo, tanto en aspectos de conocimiento básico como aplicado, investigando el papel del ácido siálico en el mecanismo de diferentes patologías del sistema hemostático, y las implicaciones terapéuticas relacionadas.

Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar un caso con patología trombótica grave en el que hemos identificado un trastorno de sialilación transitorio y establecer las posibles conexiones con mecanismos inductores de la acción de sialidasas.
2. Caracterizar biológicamente las trombopenias inmunes refractarias a los tratamientos clásicos (esteroides, inmunoglobulinas, esplenectomía) e identificar nuevos marcadores de riesgo y nuevas dianas terapéuticas aplicables a ciertos pacientes, como podrían ser los inhibidores de neuraminidasa.
3. Valorar los efectos en el sistema hemostático de la eliminación enzimática completa del ácido siálico en un modelo *in vitro*, analizando tanto efectos

globales en plaquetas, coagulación y hemólisis, como la repercusión individual en proteínas específicas.

Capítulo I

**Desialilación transitoria en combinación con una
nueva deficiencia de antitrombina asociada a trombosis
grave y recurrente bajo tratamiento anticoagulante**

Referencia: Revilla, N.; et al. 2017. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. *Scientific Reports*, 7,44556.

1. Introducción

Los estados de hipercoagulabilidad son un conjunto de enfermedades que predisponen al desarrollo de trombosis, incluyendo infarto agudo de miocardio, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica y trombosis venosa profunda.

En un evento trombótico suelen coexistir varios factores de riesgo, tanto congénitos como adquiridos. La trombofilia congénita está causada por una amplia variedad de anomalías genéticas (siendo la deficiencia de antitrombina la más grave) y resulta en un riesgo de trombosis recurrente permanente (Di Minno et al, 2015). Además, la presencia de un factor adquirido en determinados momentos, puede alterar aún más un sistema hemostático ya desequilibrado o desencadenar los efectos patológicos de ciertas mutaciones, produciendo eventos trombóticos (Navarro-Fernández et al, 2016). Desafortunadamente, hasta la fecha sólo se ha identificado un pequeño número de factores genéticos y adquiridos implicados en trombosis.

El estudio de pacientes con antecedentes de trombosis ha ayudado a identificar residuos clave estructurales o funcionales para proteínas hemostáticas esenciales o nuevas circunstancias que conducen a estados de hipercoagulabilidad (Lane et al, 1993). Por ello, el estudio en profundidad de casos específicos de pacientes con antecedentes de trombosis recurrente puede ayudar a identificar los mecanismos que contribuyen al desarrollo de esta complicación, así como nuevos factores genéticos y adquiridos. Estos hallazgos podrían contribuir a desarrollar nuevos métodos de cribado para el diagnóstico y el pronóstico de forma individualizada, así como a encontrar nuevos objetivos que podrían permitir el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para pacientes con trombosis recurrente a pesar del tratamiento anticoagulante óptimo.

Aquí, describimos el caso de una mujer que desarrolló trombosis precoces y

recurrentes en territorio venoso y arterial y murió después de un accidente cerebrovascular isquémico. La identificación de un factor de alto riesgo para trombosis (deficiencia de antitrombina tipo I causada por una nueva mutación con consecuencias conformacionales) en combinación con una desialilación transitoria de todas las proteínas plasmáticas estudiadas podría explicar el grave fenotipo clínico de esta paciente.

2. Material y Métodos

2.1. Recogida de muestras

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena antecubital en tubos de citrato. El plasma se alicuotó y se congeló a -80°C. El ADN se purificó usando el procedimiento de la precipitación por sales (“salting out”) y se almacenó a -20°C.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para Investigaciones Clínicas del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia (8/2013). Todos los sujetos incluidos dieron su consentimiento informado para participar en el estudio realizado de acuerdo con la declaración de Helsinki, modificada en Edimburgo en 2000.

2.2. Screening de trombofilia

El screening de trombofilia incluyó el análisis de polimorfismos protrombóticos (factor V Leiden, protrombina G20210A) usando sondas Taqman (C_11975250_10 y C_876802_20, respectivamente, Applied Biosystems).

La trombofilia grave (deficiencia de antitrombina, proteína C y proteína S) se evaluó mediante ensayos funcionales y/o antigénicos usando métodos comerciales

(Instrumentation Laboratory). Los inmunoensayos para anticuerpos anti cardiolipina (aCL) y beta2-glicoproteína I (a β 2GPI) se realizaron mediante ensayos comerciales (HemosIL® AcuStar Antiphospholipid assay panel; Instrumentation Laboratory) (DE Moerloose *et al*, 2010). La actividad funcional de la antitrombina (anti-FXa y anti-FIIa) se determinó por métodos cromogénicos en plasma citratado (Corral *et al*, 2007). Los niveles antigénicos de antitrombina en plasma se midieron mediante un ELISA casero. La inmunoelectroforesis cruzada se llevó a cabo como se ha descrito previamente por el grupo (Corral *et al*, 2003).

2.3. Estudio molecular del gen *SERPINC1*

Las mutaciones en *SERPINC1*, el gen que codifica la antitrombina, se determinaron secuenciando los 7 exones y sus regiones flanqueantes, así como la región promotora, empleando los cebadores y las condiciones ya descritas por el grupo (de la Morena-Barrio *et al*, 2012).

2.4. Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) (PAGE) en condiciones desnaturalizadas (reducidas y no reducidas) y no desnaturalizadas (tanto en presencia como en ausencia de urea 6 M) se realizó como se ha descrito (Corral *et al*, 2004). Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno. La antitrombina se marcó con un anticuerpo policlonal de conejo antitrombina humana (Sigma-Aldrich), seguido de conjugado

de peroxidasa de burro anti IgG-conejo (GE Healthcare), con detección mediante un kit de ECL (Amersham Biosciences).

Otras proteínas del plasma evaluadas mediante Western blot fueron el FXI, FXII, protrombina, fibrinógeno, α 1-antitripsina y TFPI. Los anticuerpos específicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos de electroforesis en gel con anticuerpos y poliacrilamida (PAGE) para evaluar las proteínas plasmáticas.

Proteína	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	Condiciones gel PAGE
	Referencia	Tipo		
Antitrombina	A9522 (Sigma)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	Nativo (+/- 6M urea); SDS (CR y CNR)
FXI	GA-FXI-AP (Enzyme Research Laboratories)	Policlonal de cabra	A-9452 (Sigma)	SDS (CNR)
FXII	MAI-108028 (Thermo Scientific)	Monoclonal de ratón	NA931V (Amersham)	SDS (CR)
Fibrinógeno	A0080 (Dako)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	SDS (CR)
FII	Ab113431 (ABCAM)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	SDS (CR)
TFPI	ADG72 (American Diagnostica)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	SDS (CNR)
α 1-antitripsina	A0012 (Dako)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	SDS (CR)

Abreviaturas: SDS, en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio; CR, condiciones reducidas; CNR, condiciones no reducidas.

2.5. Estudios de glicómica básica

2.5.1. Tratamiento enzimático del plasma

El análisis glucémico básico se realizó mediante el tratamiento del plasma con PNGase F o una Neuraminidasa de amplio espectro (que cataliza la hidrólisis de residuos enlazados α 2-3, α 2-6 y α 2-8 de ácido N-acetil-neuramínico de glicoproteínas y oligosacáridos), como se describió anteriormente (Martínez-Martínez *et al*, 2010).

2.5.2. Análisis de glicoformas de la transferrina (HPLC)

El análisis por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) de las glicoformas de la transferrina se realizó en plasma citrado como se ha descrito (Helander *et al*, 2003). Brevemente, la transferrina se saturó completamente con hierro mezclando 100 μ L de plasma con 20 μ L de FeNTA (1,67 mM). A continuación, las lipoproteínas en la muestra se precipitaron mediante la adición de 20 μ L de sulfato de dextrano al 10%, CaCl₂ 1 mM durante 60 min a 4°C y luego se centrifugó a 3500 g a 4° C durante 5 min. Del sobrenadante, 130 μ L fueron retirados y concentrados a 3500 g a 4° C en un filtro YM-10 Microcon (Millipore), diluidos con 260 μ L de agua y transferidos a viales de HPLC de vidrio, e inyectados (100 μ L) en el sistema de HPLC (Cromatografía Líquida Agilent Serie 1100, Agilent Technologies). La separación se realizó en una columna de cromatografía de intercambio de aniones SOURCE® 15Q PE 4.6 / 100 (Amersham Biosciences) a 22 ° C, mediante elución en gradiente de sal lineal a un caudal de 1,0 ml / min. La cuantificación de las glicoformas de transferrina se basó en la absorbancia selectiva del complejo hierro-transferrina a 470 nm. La cantidad relativa de cada

glicoforma se calculó como un porcentaje del área bajo la curva, utilizando la integración de referencia.

2.6. Estudios de glicómica avanzada: Q-TOF de la transferencia

Para espectrometría de masas de alta resolución de transferrina, se purificó una muestra de plasma de 10 μ l usando beads anti - transferrina. Se diluyó una muestra de plasma de 10 μ l con 90 μ l de solución de NaCl al 0,9% y se cargó en una columna giratoria (Pierce). La muestra se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de seis etapas de lavado de 700 μ l de Tris-HCl 10 mM, pH 7 y una sola elución (50 μ l, glicina-HCl 100 mM, pH 2,7). La fracción eluida se neutralizó con Tris-HCl 1,0 M (pH 9,0) y se analizó en un instrumento microfluídico 6540 LC-chip-QTOF (Agilent Technologies) usando un chip de proteína C8. El análisis de los datos se realizó utilizando el software de análisis cualitativo Agilent Mass Hunter B.04.00. El software Agilent BioConfirm se utilizó para deconvolucionar los datos brutos de distribución de carga a datos masivos reconstruidos.

2.7. Modelo recombinante

La mutación en *SERPINC1* identificada en la paciente se generó en el plásmido antitrombina pCEP4-S169A, proporcionado generosamente por el Prof. J Huntington (Universidad de Cambridge, RU), utilizando el kit Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). La expresión recombinante de antitrombina silvestre y mutante se realizó en células renales de embriones humanos que expresan el antígeno nuclear 1 de Epstein Barr (HEK-

EBNA) como se describió previamente (Martinez-Martinez *et al*, 2010). Brevemente, las células se cultivaron en DMEM con medio GlutaMAX-I (Invitrogen) suplementado con 5% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich) al 60% de confluencia a 37 °C o 30°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Se transfectaron plásmidos de tipo silvestre (WT) o mutantes durante 30 minutos en OptiMEM con lipofectamina LTX (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de 24 horas, las células se lavaron con PBS y se intercambiaron en medio CD-CHO (Invitrogen) suplementado con 4 mM de L-glutamina y 0.25 mg/ml de Geneticin (Invitrogen). Las células se cultivaron durante 10 días y el medio de cultivo se recogió cada 2 días. Las células se lavaron extensamente con PBS estéril y luego se lisaron con 50 µl de tampón de lisis (10 mM de TiHCl, 0.5 mM de DTT, 0.035% de SDS, 1 mM de EGTA, 50 mM de sodio fluoruro, ortovanadato de sodio 50 µM, benzamidina 5 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 20 mM). El lisado se evaluó mediante SDS-PAGE y Western blot. Como control de carga, se utilizó la expresión de β -actina.

3. Resultados

3.1 Caso clínico

El probando fue una mujer con una historia de 40 años de evolución de trombosis grave y recurrente tanto en territorio arterial como venoso a pesar de adecuado tratamiento anticoagulante. Se diagnosticó un tromboembolismo pulmonar (TEP) en el puerperio a los 30 años. En los siguientes 4 años, tuvo varios episodios de trombosis venosa profunda (TVP), desarrollando un síndrome post-trombótico con insuficiencia venosa crónica severa. Se recomendó por ello tratamiento anticoagulante indefinido con antagonistas de la vitamina k.

A los 34 años, fue diagnosticada de un cáncer renal localizado que se trató con éxito mediante nefrectomía radical derecha. Además, tenía antecedentes de hipertensión arterial pulmonar severa (secundaria a TEP previos), hipertensión arterial y fibrilación auricular diagnosticada a los 60 años. En 2013, a pesar del tratamiento anticoagulante (INR 2.0), presentó un infarto renal agudo por oclusión completa de la arteria renal segmentaria, desarrollando enfermedad renal crónica estadio 3 secundaria a la pérdida de masa renal (nefrectomía derecha previa e infarto en el riñón izquierdo).

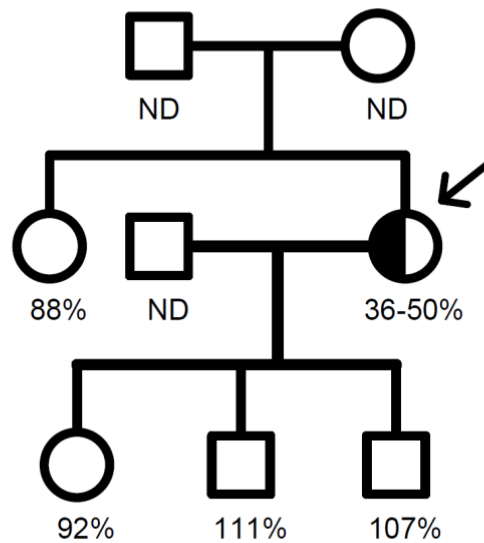
Un año después (2014), desarrolló isquemia crítica de las extremidades que requirió trombectomía de la arteria poplítea, angioplastia y colocación de stent en la arteria tibial anterior. Dos meses después del procedimiento endovascular, ingresó en el hospital por TEP agudo a pesar de una anticoagulación oral óptima (INR 2,65). Poco después de eso (2015), tuvo un accidente cerebrovascular cardioembólico que no respondió a la terapia fibrinolítica inicial. Fue exitus dos meses después de este último episodio a la edad de 70 años.

3.2. Estudio de trombofilia

El estudio de trombofilia solo identificó una deficiencia de antitrombina. Los ensayos para anticuerpos anticardiolipina y anti- β 2-glicoproteína I (IgG e IgM) fueron negativos. No se realizó el anticoagulante lúpico ya que la paciente estaba de forma continua bajo tratamiento con heparina no fraccionada y/o antagonistas de la vitamina K. Estudios adicionales sobre antitrombina revelaron una disminución de la actividad del cofactor de heparina (factor anti-X activado -anti-FXa-) (36-50%) y niveles antigénicos de antitrombina reducidos (40-52%, rango normal 80% -120%). Estos resultados apoyan una deficiencia de tipo I. Los estudios familiares descartaron

deficiencia de antitrombina en los familiares disponibles (Figura 1).

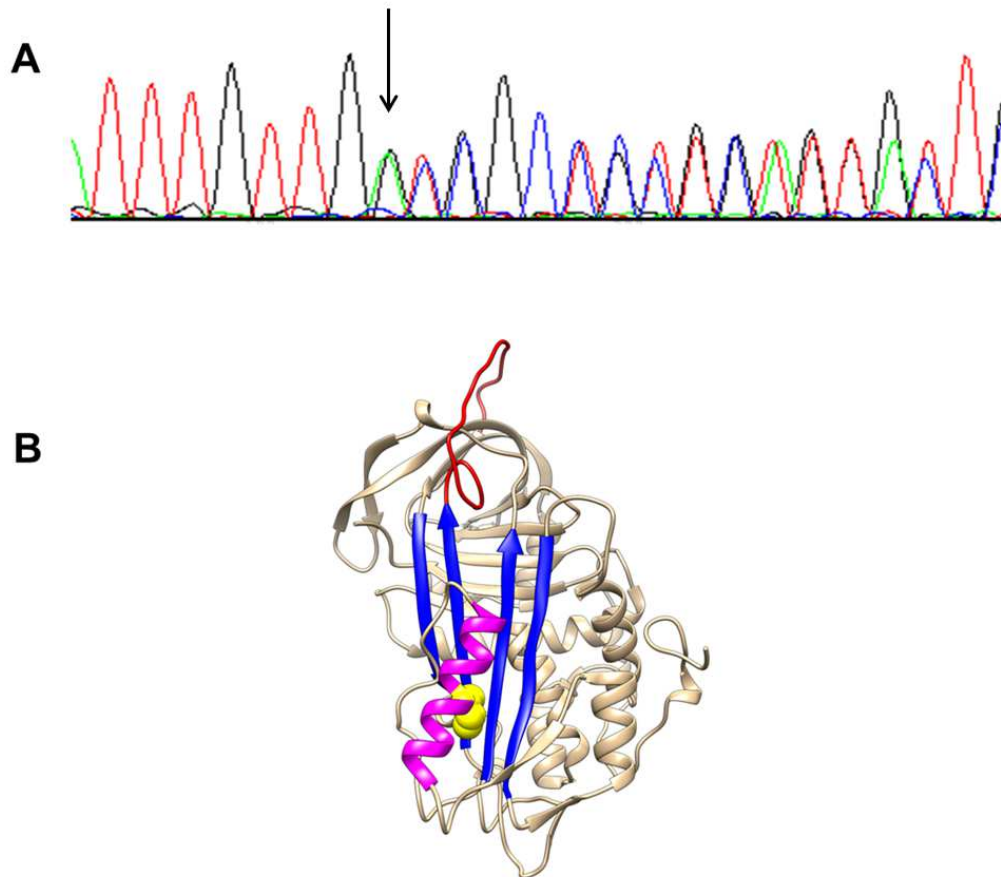
Figura 1. Pedigrí del probando (flecha).



La c.651-653delCAT se identificó en el probando (flecha). La actividad de la antitrombina (anti-FXa) también está indicada. Rango normal 80% -120%. ND: no determinado.

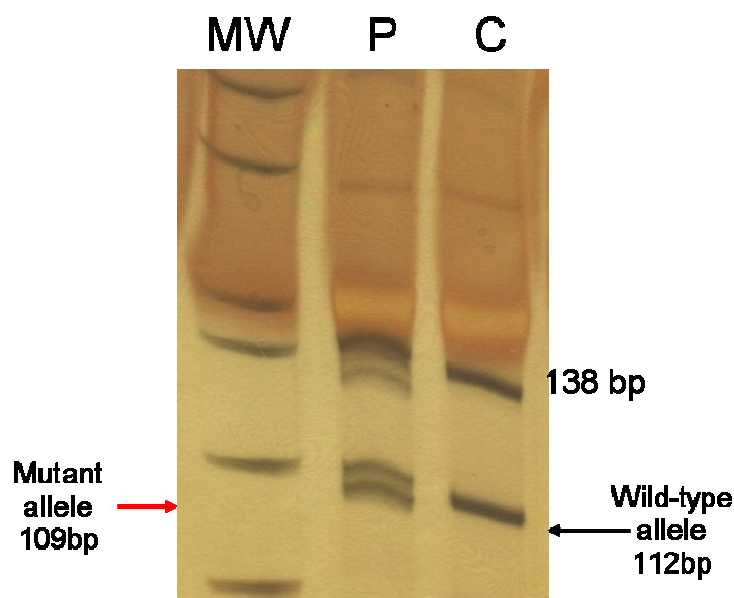
El análisis de *SERPINC1* reveló una nueva delección heterocigótica de 3 nucleótidos (c.651-653delCAT) en el exón 4 que dio como resultado una delección en el marco de la isoleucina 218 (p.Ile218del). Este residuo está altamente conservado en serpinas, y se encuentra en la hélice F (Figura 2). La mutación se verificó mediante una PCR de alelo específico seguido de análisis de restricción (PCR-ASRA) utilizando Tfi I (Figura 3).

Figura 2. Identificación de la mutación en *SERPINC1* responsable de la deficiencia de antitrombina en la probando.



A) Electroferograma del exón 4 que muestra (flecha) la eliminación heterocigota de tres pares de bases (c.651-653delCAT). B) Estructura terciaria de la antitrombina mutada con el residuo eliminado, marcado en amarillo, ubicado en la hélice F (magenta). La hoja A central está coloreada en rojo y el centro reactivo en rosa.

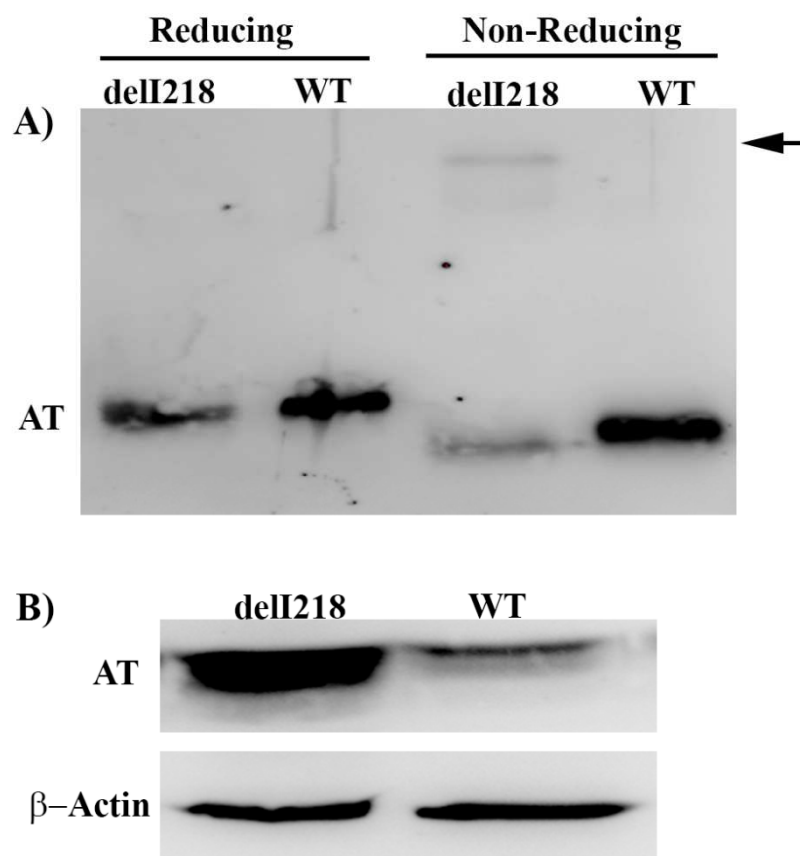
Figura 3. Verificación de la c.651-653delCAT identificada en la paciente mediante PCR-ASRA.



La PCR del exón-4 silvestre (wild-type, 250 pb) se escindió mediante TfiI en 2 fragmentos de 138 y 112 pb. El patrón de restricción del alelo mutante (mutant allele) contiene dos fragmentos de 138 pb y 109 pb. Abreviaturas: C, control; P, paciente; MW, marcador de peso molecular; bp, pares de bases.

La expresión de la variante en el modelo recombinante confirmó la relevancia de Ile218 en el plegamiento y en la secreción de la molécula. Por ello, cuando se expresó el plásmido que contenía la mutación, sólo se secretaron trazas de la variante al medio acondicionado, mientras que la proteína se retuvo intracelularmente (Figura 4). Además, también se identificaron polímeros unidos a puentes disulfuro (Figura 4).

Figura 4. Expresión de antitrombina tipo silvestre y p.Ile218del (del218) en células HEK-EBNA.



La antitrombina se detectó mediante SDS-PAGE y Western-blot. A) Medio de cultivo. Los dímeros unidos a puentes disulfuro se señalan mediante la flecha.

B) Lisado intracelular. La β -actina se empleó como control de carga.

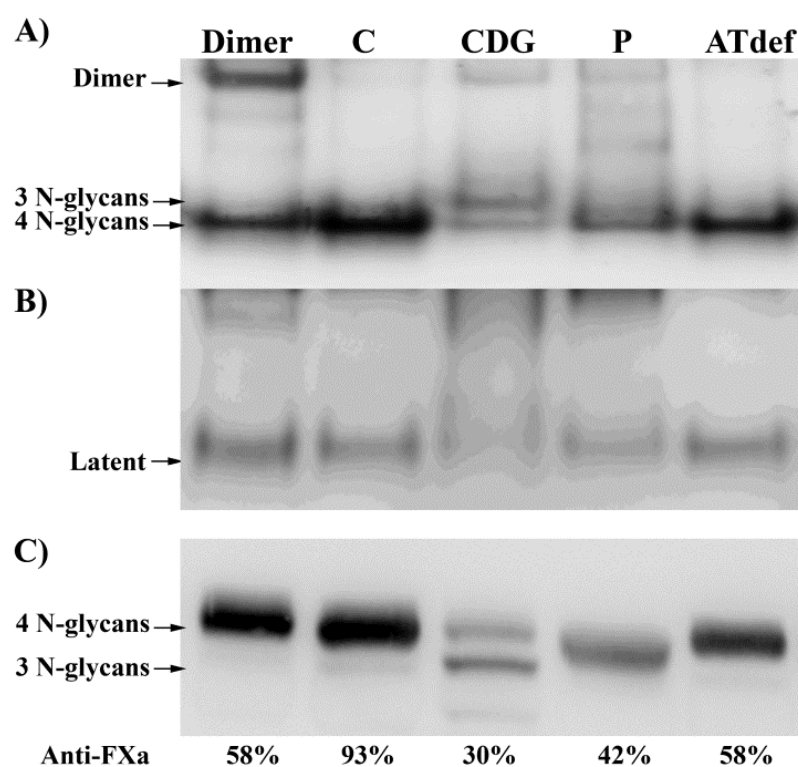
Abreviaturas: AT, antitrombina; WT, silvestre.

3.3. Desialilación generalizada de proteínas plasmáticas

Se evaluó la antitrombina plasmática por análisis electroforético en Western Blot. En la electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE), se observó una

expresión reducida de antitrombina en el plasma (Figura 5A). Los niveles de antitrombina latente también estaban disminuidos (Figura 5B). Curiosamente, la mayoría de la antitrombina plasmática residual en la paciente, teóricamente codificada por el alelo de tipo silvestre, mostró una movilidad electroforética más rápida en SDS-PAGE que la de los sujetos control y otros pacientes con deficiencia de antitrombina heterocigótica (Figura 5C). La movilidad de esta antitrombina anormal fue intermedia entre la de formas con 4 N-glicanos y formas con 3 N-glicanos, este último incrementado en pacientes PMM2-CDG, un trastorno congénito de glicosilación (CDG) raro (Scott et al, 2014) (Figura 5C) .

Figura 5. Características electroforéticas de la antitrombina plasmática en la probando (P), un paciente con deficiencia de antitrombina tipo I causada por la eliminación del gen completo en un alelo (ATdef), un paciente con PMM2-CDG, que tiene aumentado los niveles de formas con 3 N -glicanos y reducciones de las formas con 4 N-glicanos (CDG), un control sano (C) y un paciente con una mutación missense (p.Pro112Ser) que conduce a la formación de dímeros unidos por disulfuros (Dimer).



A) PAGE nativo. Los dímeros unidos a puentes disulfuro, las formas con 3 y 4 N-glicanos están señalados con flechas. B) PAGE nativo + urea 6 M. Se muestra la banda correspondiente a la antitrombina latente. C) SDS-PAGE. Los valores anti-FXa de estas muestras también se muestran.

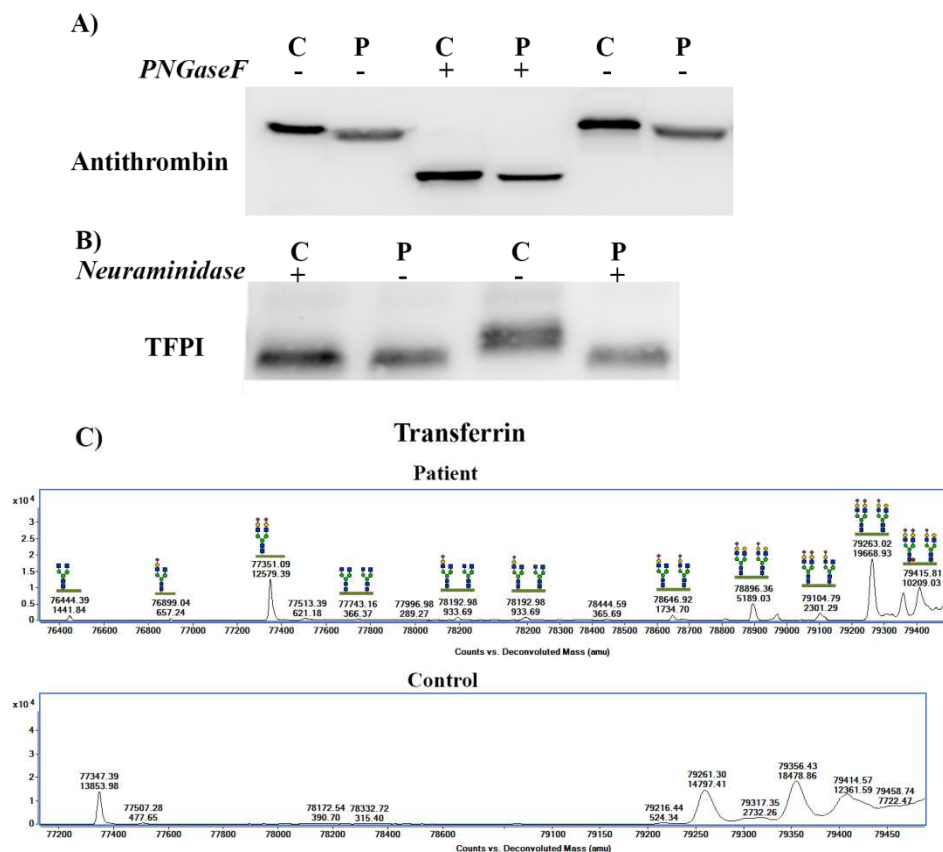
La presencia de una molécula de antitrombina más pequeña codificada por un alelo de tipo silvestre sólo puede explicarse por una modificación postraducciona. La ausencia casi completa de bandas bien definidas de antitrombina detectadas en geles nativos (Figura 5A) sugirió un defecto significativo que afecta la carga de la molécula. Dado que la N-glicosilación es la única modificación postraducciona de la antitrombina que implica carga (Hansson & Stenflo, 2005), primero analizamos si la antitrombina de esta paciente tenía una alteración en la glicosilación tratando el plasma de la probando y de los controles con N-glicosidasa F (PNGaseF), una enzima que libera todo el N-glicano de la proteína. Este tratamiento igualó la movilidad electroforética de la antitrombina de la paciente con la de los controles (Figura 6A), lo que apoya un defecto de glicosilación. La movilidad intermedia de esta antitrombina en comparación con las formas observadas en PMM2-CDG pacientes (Figura 5C) apoyó un defecto de glicosilación más leve.

Este defecto de glicosilación también se observó cuando se evaluaron otras proteínas plasmáticas en el probando (FXI, FXII, FII, fibrinógeno y α 1-antitripsina – Figura 7-), y fue particularmente evidente al evaluar el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (Figura 6B). Dado que el TFPI fue la proteína plasmática con la mayor diferencia de movilidad entre la paciente y los controles, elegimos esta molécula para evaluar los defectos específicos de la glicosilación, centrándonos en la sialilación. Así, tratamos el plasma de la paciente y los controles con una neuraminidasa de amplio espectro, una enzima que libera los ácidos siálicos terminales de la porción de N-glicanos. Como se muestra en la figura 6B, este tratamiento normalizó la movilidad del TFPI de la paciente y del control, lo que apoya una hiposialación en la paciente.

La evidencia final de una gran desialilación heterogénea en la muestra de esta

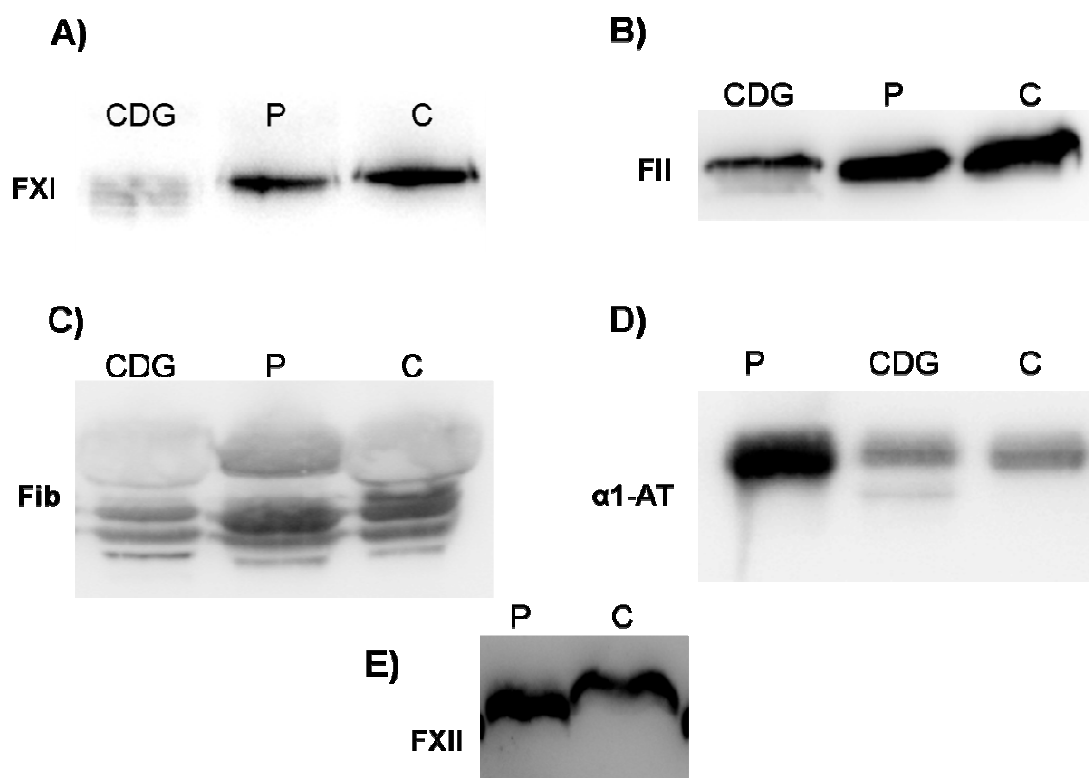
paciente se obtuvo mediante análisis de espectrometría de masas (Q-TOF) de glicoformas de transferrina (Figura 6C).

Figura 6. Defectos globales de glicosilación en la paciente



A) Características electroforéticas de la antitrombina plasmática de la paciente (P) y un control sano (C) con (+) o sin (-) tratamiento con PNGaseF. Las muestras sin tratamiento se representan por duplicado. B) Características electroforéticas del inhibidor de la vía del factor tisular plasmático (TFPI) de la paciente (P) y un control sano (C) con (+) o sin (-) tratamiento con neuraminidasa. C) Análisis Q-TOF de glicoformas de transferrina en la paciente y un control.

Figura 7. Características electroforéticas de las proteínas plasmáticas de la paciente

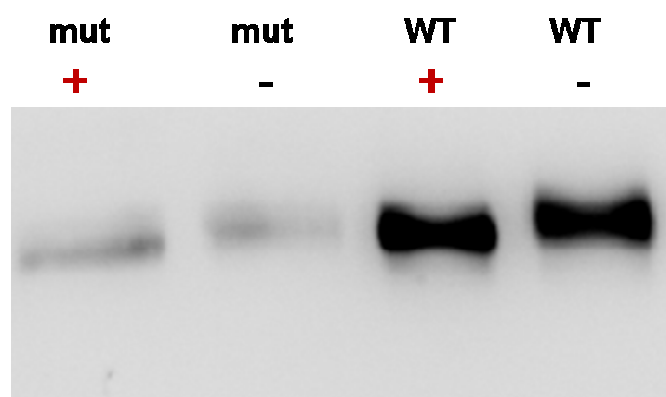


Abreviaturas: Fib, fibrinógeno; α 1-AT, α 1-antitripsina; C, control; P, paciente; CDG, PMM2-CDG.

Como la variante monomérica de antitrombina recombinante también parecía tener una movilidad electroforética ligeramente más rápida que la antitrombina de tipo silvestre en SDS-PAGE (Figura 3), para evaluar si esta variante pudiera tener algún efecto sobre la función o ubicación de las sialiltransferasas o neuraminidasas una vez que se retiene intracelularmente (Figura 4), los medios acondicionados de las células transfectadas con plásmidos mutantes o de tipo silvestre se trataron con neuraminidasa. Como se muestra en la figura 8, este tratamiento no normalizó la movilidad

electroforética de ambas antitrombinas, lo que confirma que la movilidad aberrante en SDS-PAGE de la variante recombinante se explica por la delección de Ile218. Además, la incubación de plasma de la paciente con plasma de un control sano a 37°C durante 24 h no desialilaba ninguna de las proteínas estudiadas (no se muestra).

Figura 8. La antitrombina secretada al medio condicionado de células transfectadas con plásmidos de tipo silvestre (WT) y mutante (mut), tratados (+) o no (-) con neuraminidasa.



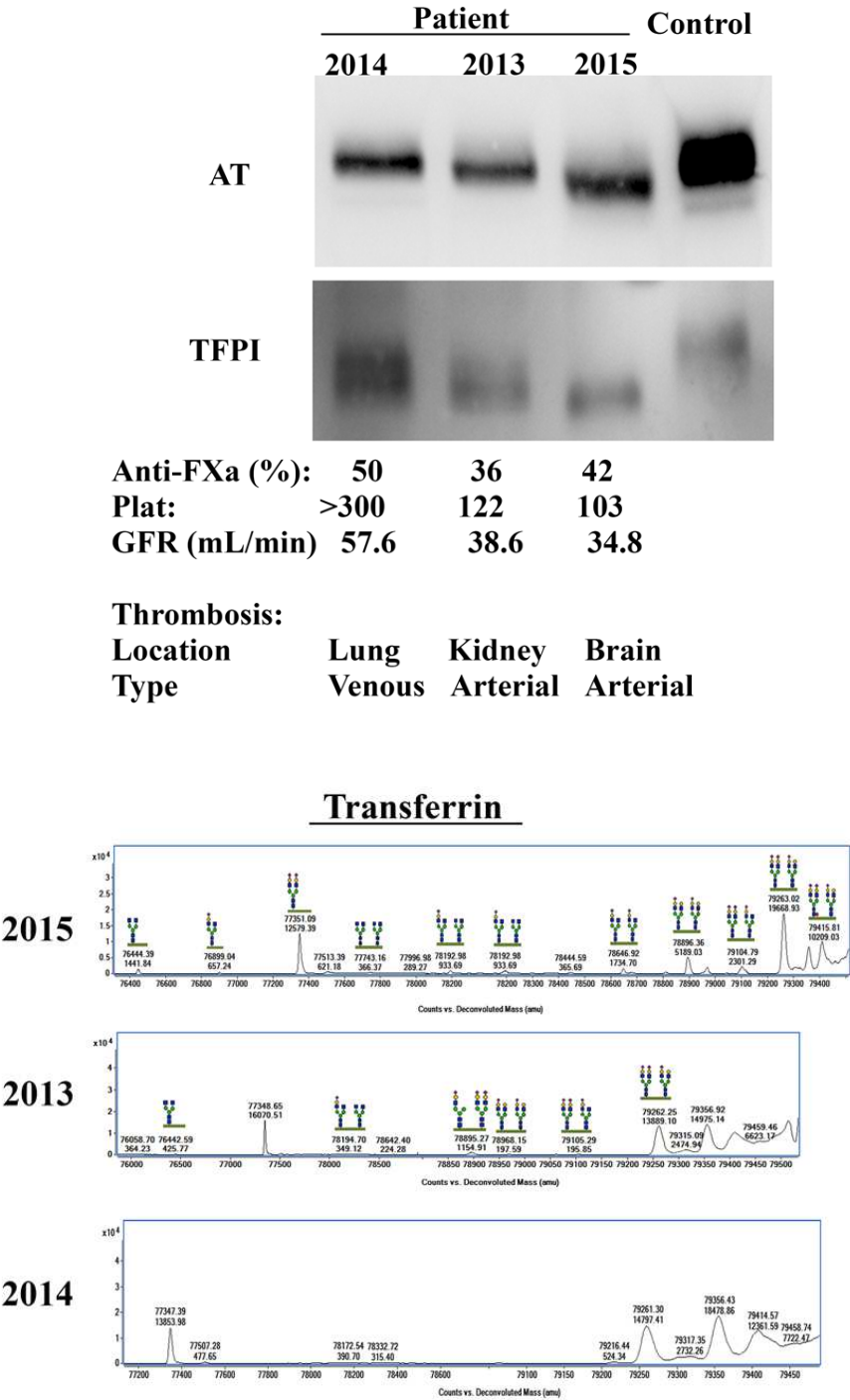
3.4. Desialilación transitoria y variable de proteínas plasmáticas

El perfil de hiposialilación generalizada y casi completa no fue estable en el tiempo. El análisis de las mismas proteínas por SDS-PAGE y Q-TOF en muestras de plasma recogidas en diferentes momentos, reveló una desialilación parcial en un momento y un patrón normal en otro, con buena concordancia entre ambos métodos (Figura 9). La muestra con desialilación completa de acuerdo con el análisis SDS también mostró niveles más altos de formas hiposialiladas de transferrina, y no se observó desialilación por Q-TOF en la muestra con patrón electroforético normal (Figura 9). Estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo adquirido de

hiposialilación. En los momentos en que se detectó la desialilación, la paciente no tenía signos clínicos que sugirieran infección bacteriana, fúngica o viral y no se detectaron agentes infecciosos mediante pruebas microbiológicas.

Curiosamente, la desialilación fue obvia en muestras recolectadas después de eventos trombóticos arteriales y se asoció con actividad reducida anti-FXa (36% y 42%), recuentos de plaquetas más bajos ($122 \times 10^9/L$ y $103 \times 10^9/L$) y tasa de filtración glomerular disminuida (GFR) (38,9 ml / min y 34,8 ml / min) mientras que en el momento de la trombosis venosa, cuando la desialilación no era evidente, tenía un recuento de plaquetas de más de $300 \times 10^9/L$, actividad anti-FXa del 50% y GFR de 57,6 mL / min.

Figura 9. Análisis de proteínas (Antitrombina -AT-, TFPI y transferrina) en muestras de plasma recogidas en diferentes momentos del paciente.



También se muestran los valores de diferentes análisis de sangre en estas muestras: actividad anti-FXa, recuentos de plaquetas (Plat) y tasa de filtración glomerular (GFR). También se detalla la ubicación y el tipo de trombosis que precede a la recolección de cada muestra.

4. Discusión

La trombosis es una enfermedad enigmática. En la mayoría de los casos, la razón de por qué ocurre una trombosis en particular sigue siendo un misterio y una de las preguntas sin respuesta es por qué los pacientes con trombofilia congénita documentada están libres de eventos durante un largo período de la vida. La penetrancia incompleta de muchas mutaciones protrombóticas es otra clara evidencia de la compleja naturaleza de la trombosis, que requiere de diferentes factores genéticos (incluso para factores de riesgo congénitos graves como la deficiencia de antitrombina) y ambientales, muchos de ellos desconocidos. Además, las trombosis venosas y arteriales se consideran tradicionalmente como dos enfermedades diferentes con respecto a la fisiopatología, la epidemiología y las estrategias de tratamiento. Sin embargo, esta distinción categórica es demasiado estricta y cada vez es más evidente la similitud entre ambos trastornos (Lijfering et al, 2011). Los casos extraordinarios son modelos excelentes que pueden abrir nuevas perspectivas o ayudar a identificar nuevos factores o mecanismos implicados en la trombosis. El caso clínico estudiado, una mujer que tuvo trombosis venosa y arterial severa y recurrente a lo largo de su vida, que sufrió complicaciones relacionadas con los eventos trombóticos (principalmente hipertensión arterial pulmonar severa, enfermedad renal crónica estadio 3 y comorbilidades relacionadas con el accidente cerebrovascular isquémico) y con una evidente imposibilidad para prevenir la trombosis con antagonistas de la vitamina K, ha proporcionado información realmente interesante sobre el fuerte defecto trombofílico presente en la paciente y sobre un potencial nuevo factor de riesgo protrombótico.

Los estudios trombofílicos revelaron un defecto grave, la deficiencia de antitrombina, que se explicó por una nueva mutación en SERPINC1 (c.651-653delCAT). La eliminación de un residuo (isoleucina 218) es responsable de la

deficiencia de tipo I probablemente por un mecanismo conformacional (Corral et al, 2005), de acuerdo con los resultados observados en el modelo recombinante. Sin embargo, el fenotipo clínico tan severo mostrado por la paciente podría ser un signo de la presencia de factores de riesgo adicionales.

Los trastornos de glicosilación se han reconocido recientemente como una nueva condición protrombótica que respalda la relevancia que los glicanos podrían tener en el sistema hemostático (de la Morena-Barrio et al, 2016). Los ácidos siálicos desempeñan un papel clave en la estabilización de moléculas y membranas, así como en la modulación de las interacciones con el medio ambiente. Algunas funciones surgen de su carga electronegativa relativamente fuerte que puede influir en la conformación de glicoproteínas (Thornhill et al, 1996). La porción de carbohidrato de las glicoproteínas juega un papel importante en su función (plegamiento, secreción y / o interacción de las proteínas así como características inmunológicas, capacidad funcional o aclaramiento) (Chandrasekhar et al, 2016). Debido a que los ácidos siálicos están implicados en tantas funciones celulares, las alteraciones de su biosíntesis o degradación pueden conducir a problemas médicos. Los ácidos siálicos son vulnerables a la acción de esterasas microbianas, sialidasas y liasas debido a su posición (Varki & Schauer, 2009). También se ha observado que los cambios en el contenido de ácido siálico están implicados en enfermedades degenerativas como la aterosclerosis y la diabetes, así como en trastornos neurológicos como en la enfermedad de Alzheimer y en el alcoholismo (Freeze & Schachter, 2009). Además, la unión al endotelio de las proteínas plasmáticas así como el ácido siálico de los eritrocitos pueden experimentar marcados cambios en respuesta a estímulos inflamatorios. Se han generado una variedad de ratones deficientes en sialiltransferasas con fenotipos interesantes y específicos, que van desde la unión alterada a Siglec-2 / CD22 (ST6Gal-I nulo) hasta defectos en la maduración de células T

(ST3Gal-I nulo) (Courtney et al, 2009; Martin et al, 2002). Proponemos que esa pérdida de ácidos siálicos también podría afectar el sistema hemostático con posibles consecuencias protrombóticas.

Recientemente, la pérdida de ácido siálico por la neuraminidasa y la consecuente exposición de los penúltimos residuos de β -galactosa se ha identificado como un factor determinante para la eliminación de plaquetas circulantes senescentes a través del receptor hepático de Ashwell-Morrell (AMR) (Grozovsky et al, 2015). La desialilación de plaquetas también contribuye a su aclaramiento en trombocitopenia inmune (PTI) refractaria, sugiriendo que los inhibidores de sialidasa podrían considerarse un abordaje terapéutico en estos pacientes (Li et al, 2015a). Además, se han descrito sialidasas no plaquetarias que provocan una eliminación acentuada de plaquetas desialiladas en diversas enfermedades infecciosas como *Streptococcus pneumoniae*, Virus Influenza o *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), proporcionando un vínculo entre la infección y la trombopenia (Grewal et al, 2008; Alioglu et al, 2010; Tribulatti et al, 2005). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito de una desialilación generalizada de proteínas plasmáticas en ninguna de estas situaciones patológicas. La desialilación también se ha asociado recientemente con la apoptosis y la fagocitosis de plaquetas en pacientes con trombopenia aislada prolongada después del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Zhang et al, 2015).

El presente caso muestra una desialilación global, transitoria y fluctuante de proteínas plasmáticas. La negatividad para la detección de patógenos microbianos en muestras con desialilación evidente no sugiere la existencia de actividad sialidasa exógena procedente de tales fuentes. La afectación de las proteínas no sólo sintetizadas

en el hígado, sino también en células endoteliales tales como TFPI, y los experimentos realizados con la variante recombinante de la antitrombina, descartaron una modificación potencial del proceso de sialilación durante la maduración de la proteína secundaria a la acumulación de antitrombina mutante en el aparato de Golgi. Si bien no tuvimos evidencia directa de la actividad neuraminidasa en las muestras de la paciente, no se puede descartar una elevada actividad neuraminidasa del endotelio, las plaquetas u otras células circulantes. En realidad, las neuraminidasas endógenas están implicadas en el aclaramiento fisiológico de las glicoproteínas envejecidas (Yang et al, 2015). La sobreexpresión endógena o la deslocalización de las sialidasas inducidas por un factor desconocido pueden proponerse como una hipótesis interesante. En este marco, varios estudios han informado una alteración de la sialilación relacionada con el estrés oxidativo (Goswami & Koner, 2002; Görgün et al, 2002; Senthil et al, 2004; Manju et al, 2002). El estrés oxidativo y la liberación de radicales libres observados en la diabetes, neoplasias y en el envejecimiento pueden causar la desialilación y la carbonilación de las proteínas plaquetarias *in vitro* (Goswami & Koner, 2002). Es posible que el estrés oxidativo inducido por la uremia en los momentos en los que se observa una disminución del filtrado glomerular pueda contribuir a la desialilación observada (Yoon et al, 2007). Se requieren más estudios para identificar el mecanismo involucrado en la desialilación de proteínas plasmáticas y sus posibles consecuencias protrombóticas.

5. Conclusión

Esta es la primera descripción de una desialilación significativa y transitoria de todas las proteínas plasmáticas analizadas asociadas con el desarrollo de eventos tromboembólicos. La ausencia de los residuos terminales electronegativos de N-

glicanos y O-glicanos puede modular las interacciones proteína-proteína de los elementos hemostáticos. Especulamos que este defecto puede exacerbar el estado protrombótico causado por la deficiencia de antitrombina, contribuyendo al desarrollo de eventos trombóticos, preferiblemente en el territorio arterial, incluso cuando la paciente estaba bajo tratamiento anticoagulante. Desafortunadamente en nuestro caso, no pudimos analizar los niveles de ácido siálico en las plaquetas o la reactividad plaquetaria en los momentos en los que mostraba una desialilación evidente. Una posible desialilación de plaquetas podría asociarse con una mayor reactividad de estas, lo que podría contribuir a explicar la incapacidad de la terapia anticoagulante para evitar eventos vasculares, el desarrollo de trombosis arterial y el recuento plaquetario reducido observado en muestras con desialilación (Li et al, 2015b; Grewal et al, 2008). Se requieren más estudios para definir el impacto de la desialilación de diferentes elementos del sistema hemostático, no sólo las plaquetas, y la relevancia de las proteínas plasmáticas desialiladas para mantener el equilibrio hemostático así como su papel en el desarrollo de la trombosis. La principal limitación de este estudio es la identificación de un caso único con desialilación transitoria. Se requieren estudios adicionales para identificar nuevos casos con características similares que pueden explorarse entre pacientes con eventos tromboembólicos recurrentes a pesar de INR en rango terapéutico con antagonistas de la vitamina K. Este estudio también podría tener consecuencias terapéuticas ya que la desialilación podría ser una afección potencialmente tratable con inhibidores de la neuraminidasa.

6. Referencias

- Alioglu, B., Tasar, A., Ozen, C., Selver, B. & Dallar, Y. (2010) An experience of oseltamivir phosphate (tamifluTM) in a pediatric patient with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a case report. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, **37**, 55–8.
- Chandrasekhar, K., Ke, H., Wang, N., Goodwin, T., Gierasch, L.M., Gershenson, A. & Hebert, D.N. (2016) Cellular folding pathway of a metastable serpin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 6484–9.
- Corral, J., Hernandez-Espinosa, D., Soria, J.M., Gonzalez-Conejero, R., Ordonez, A., Gonzalez-Porras, J.R., Perez-Ceballos, E., Lecumberri, R., Sanchez, I., Roldan, V., Mateo, J., Minano, A., Gonzalez, M., Alberca, I., Fontcuberta, J. & Vicente, V. (2007) Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood*, **109**, 4258–63.
- Corral, J., Huntington, J.A., González-Conejero, R., Mushunje, A., Navarro, M., Marco, P., Vicente, V. & Carrell, R.W. (2004) Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **2**, 931–9.
- Corral, J., Rivera, J., Martínez, C., González-Conejero, R., Miñano, A. & Vicente, V. (2003) Detection of conformational transformation of antithrombin in blood with crossed immunoelectrophoresis: new application for a classical method. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **142**, 298–305.
- Corral, J., Vicente, V. & Carrell, R.W. (2005) Thrombosis as a conformational disease. *Haematologica*, **90**, 238–46.
- Courtney, A.H., Puffer, E.B., Pontrello, J.K., Yang, Z.-Q. & Kiessling, L.L. (2009)

- Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 2500–5.
- Freeze, H.H. & Schachter, H. (2009) Genetic Disorders of Glycosylation Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Görgün, F.M., Oztürk, Z., Gümüştas, M.K. & Kökogu, E. (2002) Melatonin administration affects plasma total sialic acid and lipid peroxidation levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, **65**, 695–700.
- Goswami, K. & Koner, B.C. (2002) Level of sialic acid residues in platelet proteins in diabetes, aging, and Hodgkin’s lymphoma: a potential role of free radicals in desialylation. *Biochemical and biophysical research communications*, **297**, 502–5.
- Grewal, P.K., Uchiyama, S., Ditto, D., Varki, N., Le, D.T., Nizet, V. & Marth, J.D. (2008) The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nature medicine*, **14**, 648–55.
- Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2015) The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nature medicine*, **21**, 47–54.
- Hansson, K. & Stenflo, J. (2005) Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **3**, 2633–48.
- Helander, A., Husa, A. & Jeppsson, J.-O. (2003) Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clinical chemistry*, **49**, 1881–90.

- de la Morena-Barrio, M., Antón, A., Martínez-Martínez, I., Padilla, J., Miñano, A., Navarro-Fernández, J., Águila, S., López, M., Fontcuberta, J., Vicente, V. & Corral, J. (2012) Regulatory regions of SERPINC1 gene: Identification of the first mutation associated with antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*, **107**, 430–437.
- de la Morena-Barrio, M.E., Martínez-Martínez, I., de Cos, C., Wypasek, E., Roldán, V., Undas, A., van Scherpenzeel, M., Lefeber, D.J., Toderici, M., Sevivas, T., España, F., Jaeken, J., Corral, J. & Vicente, V. (2016) Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **14**, 1549–60.
- Lane, D.A., Olds, R.J., Boisclair, M., Chowdhury, V., Thein, S.L., Cooper, D.N., Blajchman, M., Perry, D., Emmerich, J. & Aiach, M. (1993) Antithrombin III mutation database: first update. For the Thrombin and its Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, **70**, 361–9.
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M. & Ni, H. (2015a) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nature communications*, **6**, 7737.
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M. & Ni, H. (2015b) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in

- immune thrombocytopenia. *Nature communications*, **6**, 7737.
- Lijfering, W., Flinterman, L., Vandenbroucke, J., Rosendaal, F. & Cannegieter, S. (2011) Relationship between Venous and Arterial Thrombosis: A Review of the Literature from a Causal Perspective. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **37**, 885–896.
- Manju, V., Balasubramanian, V. & Nalini, N. (2002) Oxidative Stress and Tumor Markers in Cervical Cancer Patients. *The Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, **6**, 387–390.
- Martin, L.T., Marth, J.D., Varki, A. & Varki, N.M. (2002) Genetically altered mice with different sialyltransferase deficiencies show tissue-specific alterations in sialylation and sialic acid 9-O-acetylation. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 32930–8.
- Martinez-Martinez, I., Ordonez, A., Navarro-Fernandez, J., Perez-Lara, A., Gutierrez-Gallego, R., Giraldo, R., Martinez, C., Llop, E., Vicente, V. & Corral, J. (2010) Antithrombin Murcia (K241E) causing antithrombin deficiency: a possible role for altered glycosylation. *Haematologica*, **95**, 1358–1365.
- Di Minno, M.N.D., Ambrosino, P., Ageno, W., Rosendaal, F., Di Minno, G. & Dentali, F. (2015) Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thromboembolism: a meta-analysis of observational studies. *Thrombosis research*, **135**, 923–32.
- DE Moerloose, P., Reber, G., Musial, J. & Arnout, J. (2010) Analytical and clinical performance of a new, automated assay panel for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **8**, 1540–6.
- Navarro-Fernández, J., Morena-Barrio, M., Padilla, J., Miñano, A., Bohdan, N.,

- Águila, S., Martínez-Martínez, I., Sevivas, T., de Cos, C., Fernández-Mosteirín, N., Llamas, P., Asenjo, S., Medina, P., Souto, J., Overvad, K., Kristensen, S.R., Corra, J. & Vicente, V. (2016) Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*, **116**, 146–154.
- Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T. & Morava, E. (2014) Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *Journal of inherited metabolic disease*, **37**, 609–17.
- Senthil, K., Aranganathan, S. & Nalini, N. (2004) Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **339**, 27–32.
- Thornhill, W.B., Wu, M.B., Jiang, X., Wu, X., Morgan, P.T. & Margiotta, J.F. (1996) Expression of Kv1.1 delayed rectifier potassium channels in Lec mutant Chinese hamster ovary cell lines reveals a role for sialidation in channel function. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 19093–8.
- Tribulatti, M.V., Mucci, J., Van Rooijen, N., Leguizamón, M.S. & Campetella, O. (2005) The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infection and immunity*, **73**, 201–7.
- Varki, A. & Schauer, R. (2009) Sialic Acids Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yang, W.H., Aziz, P. V, Heithoff, D.M., Mahan, M.J., Smith, J.W. & Marth, J.D. (2015) An intrinsic mechanism of secreted protein aging and turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 13657–62.
- Yoon, J.W., Pahl, M. V & Vaziri, N.D. (2007) Spontaneous leukocyte activation and

oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney international*, **71**, 167–72.

Zhang, X.-H., Wang, Q.-M., Zhang, J.-M., Feng, F.-E., Wang, F.-R., Chen, H., Zhang, Y.-Y., Chen, Y.-H., Han, W., Xu, L.-P., Liu, K.-Y. & Huang, X.-J. (2015) Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. *Journal of hematology & oncology*, **8**, 116.

Capítulo II

**Trombopenia inmune primaria multirefractaria;
considerando la disminución del contenido de ácido siálico**

Referencia: Revilla, N.; et al. 2018. Multirefractory primary immune thrombocytopenia; targeting the decreased sialic acid content. *Platelets*. 8:1-9.

1. Introducción

La trombocitopenia inmune (PTI) es una enfermedad hemorrágica autoinmune caracterizada por un incremento en la destrucción plaquetaria y por una reducción en la producción de estas. Las glicoproteínas (GP) de superficie de las plaquetas, es decir, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) y / o el complejo GPIb α son los dos antígenos diana más comunes en la PTI (McMillan, 2000). Los datos anteriores en modelos murinos de PTI sugieren que la identidad del antígeno diana reconocido por los anticuerpos antiplaquetarios puede determinar el mecanismo de destrucción de plaquetas y las respuestas terapéuticas (Nieswandt *et al*, 2000; Webster *et al*, 2006). Por lo tanto, la trombocitopenia causada por anticuerpos anti- $\alpha\text{IIb}\beta_3$ probablemente esté mediada por una vía dependiente de Fc y responda a terapias relacionadas con el sistema reticuloendotelial (RES), tales como esteroides e inmunoglobulinas intravenosas (IGIV). Sin embargo, el aclaramiento de plaquetas en la PTI causada por la mayoría de los anticuerpos anti-GPIb puede ocurrir a través de un proceso independiente de Fc, y por lo tanto, muchos de estos pacientes pueden no responder a los tratamientos convencionales (Webster *et al*, 2006; Peng *et al*, 2014; Zeng *et al*, 2012). Los agonistas del receptor de la trombopoyetina (TPO-RA) son altamente eficaces en el tratamiento de la PTI primaria, obteniendo un aumento en el recuento de plaquetas en 60 a 80% de los pacientes con PTI crónica que han sido refractarios a 1 o más líneas de tratamiento (Cooper, 2017). Junto con su capacidad para estimular directamente la trombopoyesis, los TPO-RA presenta un mecanismo inmunomodulador directo o indirectamente, en parte por la restauración del equilibrio del receptor Fc γ de monocitos (Yazdanbakhsh, 2016; Liu *et al*, 2016). Porque algunos pacientes no responden a estos fármacos y si la especificidad, la afinidad y el título del anticuerpo pueden afectar tales respuestas son

algunas de las preguntas que continúan sin respuesta. Algunos estudios sugieren que los anticuerpos contra GPIIb α se asocian negativamente con la respuesta (R) a los TPO-RA (Kruse A et al. ASH 2014,#4190) mientras que otros no encuentran diferencias entre los pacientes que tienen anticuerpos anti-GPIIb y anti- α IIb β ₃ (Izak Karaev M et al. ASH 2015,#1048). En los pacientes que no responden a TPO-RA existe un incremento en la producción de megacariocitos pero no en la liberación de plaquetas de la médula ósea, un proceso que está fuertemente inhibido por anticuerpos anti-GPIIb (Chang *et al*, 2003; Barsam *et al*, 2011). Desde una perspectiva clínica, las estrategias para superar la resistencia a los TPO-RA pueden incluir la adición de agentes inmunosupresores convencionales para amortiguar el mecanismo patogénico autoinmune según lo propuesto primero por Stasi (Stasi, 2011) y confirmado recientemente en un estudio multicéntrico (Mahévas *et al*, 2016).

Además de la especificidad del anticuerpo, la ineficacia relativa de las terapias estándar que se dirigen al RES en algunos pacientes puede estar justificada por un mecanismo de eliminación de plaquetas independiente de Fc. El secuestro hepático de plaquetas en pacientes con PTI es un criterio importante para determinar la capacidad de respuesta a la esplenectomía (Sarpawari *et al*, 2010; Palandri *et al*, 2014). Los hepatocitos juegan un papel importante en el aclaramiento de plaquetas opsonizadas anti-GPIIb α , a través de la interacción entre residuos en la superficie de las plaquetas y los receptores de asialoglicoproteína Ashwell-Morell (AMR) (Li *et al*, 2015), y la desialilación mediada por anticuerpos puede ser uno de los mecanismos subyacentes a la resistencia a las terapias estándar de PTI (Tao *et al*, 2017). Por lo tanto, la pérdida de ácido siálico en la superficie de las plaquetas podría ser una nueva herramienta de diagnóstico para la identificación de pacientes refractarios (por ejemplo, mediante tinción de RCA-1), y que pueden beneficiarse potencialmente de un nuevo método

terapéutico (por ejemplo, inhibición de sialidasa). En ese sentido, en un modelo murino de PTI, el tratamiento con inhibidores de sialidasa incrementaba los recuentos de plaquetas en la trombocitopenia mediada predominantemente por anti-GPIIb α (Li *et al*, 2015). Oseltamivir fosfato, un medicamento antiviral clásico convencional en el tratamiento de pacientes con influenza, actúa como inhibidor de la sialidasa. Este agente, ha demostrado inducir un aumento en los recuentos de plaquetas en cuatro casos clínicos independientes; en dos pacientes con PTI primaria (Alioglu *et al*, 2010; Shao *et al*, 2015) y en dos pacientes adicionales con PTI relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Álvarez-Román *et al*, 2016; Bigot *et al*, 2016).

Los objetivos de este estudio fueron (i) analizar los anticuerpos antiplaquetarios, los niveles de TPO y la desialilación de plaquetas en pacientes con PTI refractarios a terapias clásicas relacionadas con RES (glucocorticoides, IGIV o esplenectomía) y también a TPO-RA, y (ii) evaluar la respuesta plaquetaria tras tratamiento con oseltamivir en casos seleccionados que muestren una pérdida notable del contenido de ácido siálico en las plaquetas.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño del estudio y recogida de muestras

Estudio prospectivo multicéntrico en el que se incluyeron un total de 35 pacientes con PTI, 16 con enfermedad multirefractaria, entre mayo de 2015 y agosto de 2017. Los pacientes elegibles tenían PTI primaria y habían recibido al menos 2 tratamientos previos para PTI. Los criterios de exclusión fueron: PTI secundaria o patologías que, en opinión del investigador, podrían afectar la realización del estudio. Se definió como PTI multirefractaria aquella que no

responde a terapias clásicas (glucocorticoides, IVIG o esplenectomía) ni a al menos un TPO-RA administrado a la dosis máxima aprobada (es decir, 10 µg/kg de peso corporal por semana para romiplostim, 75 mg/día para eltrombopag), excepto para los pacientes en los que los TPO-RA se suspendieron prematuramente debido a efectos secundarios. Si se habían administrado los dos TPO-RA, los pacientes tenían que mostrar refractariedad a ambos. Se incluyeron pacientes con PTI control, considerándose aquellos que habían mostrado un aumento en los recuentos de plaquetas con cualquiera de las terapias anteriores de acuerdo con los criterios de respuesta previamente establecidos (Rodeghiero *et al*, 2009). Como controles se analizaron adultos sanos (n = 31). Las investigaciones se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki bajo un protocolo aprobado por el Comité Ético del Hospital Reina Sofía, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los donantes y pacientes, o de sus padres.

Se extrajo sangre venosa de cada paciente y de un control sano de forma paralela en tubos de EDTA K3 al 7,5% (para hemogramas y plaquetas lavadas), de citrato de sodio tamponado 0,105 M (para la caracterización electroforética) o en tubos sin anticoagulante (para la preparación de suero) usando una aguja de calibre 21G. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el procesamiento. El plasma rico en plaquetas (PRP) y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se separaron de muestras de sangre mediante centrifugaciones por etapas a 140 x g durante 10 min (PRP) y luego 1200 x g durante 20 min a temperatura ambiente (RT) (PPP). El EDTA-PRP se lavó dos veces con PBS que contenía EDTA 5 mM y BSA al 0,2% (PBS / EDTA / BSA) y se resuspendió en Hepes 0,01 M (pH 7,4), NaCl 0,14 M y solución de CaCl₂ 2,5 mM. El suero se obtuvo a partir de sangre no anticoagulada mediante incubación a 37°C durante 30 min seguido de

centrifugación (1200 x g, 20 min). Las muestras fueron analizadas o alicuotadas y almacenadas congeladas dentro de las 24 horas siguientes a la extracción.

2.2. Especificidad de anticuerpos anti-glicoproteínas plaquetarias (Modified antigen-capture ELISA, MACE)

El ensayo MACE se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente con modificaciones menores (Menitove *et al*, 1989). Brevemente, se incubaron 500 µl de PPP del paciente con PTI con $5,7 \times 10^7$ plaquetas control lavadas durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Las plaquetas se lavaron con PBS / EDTA y el pellet obtenido tras centrifugación (10000 x g, 2 min) se resuspendió en 90 µl de PBS y fue solubilizado con 150 µl de Triton X-100 al 10% durante 30 min a 4°C. Luego, se añadieron 50 µl de lisado de plaquetas sensibilizado a cada pocillo de una placa de microtitulación (Immulon 2HB, 655101, Greiner Bio One, España) que se había recubierto con mAb LJ-P3 (anti GPIIb/IIIa) y LJ-CP8 (anti β_3) (60 µg / ml en tampón de carbonato sódico 0,05 mol / l). La placa se incubó durante la noche a 4 ° C y se lavó cuatro veces con PBS / Tween. A continuación, se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-IgG humana (Fc específico) marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluido 1: 700 en Tween al 0,08% + BSA al 1% a cada pocillo, se incubaron y se lavaron como se indica anteriormente. Después de cuatro etapas de lavado, se añadió finalmente el sustrato (P-nitrofenilfosfato) en 0,9 M de tampón de dietanolamina, pH 9,8, que contenía Mg_2Cl 0,5 mM. Se registró la absorbancia a 405 nm. Se analizaron cuatro sueros normales en cada placa como controles, y una absorbancia superior a 3 desviaciones estándar por encima de la absorbancia media registrada para los controles se consideró arbitrariamente como una reacción positiva.

2.3. Citometría de flujo

Las plaquetas lavadas ($\approx 30 \times 10^9/L$) se incubaron con sueros (2:1 v / v) durante 60 min a 37 ° C, y con anticuerpos monoclonales marcados (Becton Dickinson, San Jose, CA) para cuantificar la expresión plaquetaria de las principales GP de membrana (GPIb α [CD42b] e integrina αII_b [CD41a]) a través de una técnica directa estándar. Para el análisis de P-selectina expresada en superficie (marcador de liberación de gránulos alfa) y granulofisina (marcador de gránulos densos y de liberación lisosómica) se usaron anticuerpos anti-CD62-PE y anti-CD63-PE, respectivamente (Becton Dickinson). Para cuantificar la desialilación, las plaquetas lavadas e incubadas con sueros específicos se marcaron con RCA-1 fluoresceína (Vector Labs, Burlingame, CA) (5 μg / ml, 60 min, 37 ° C) que se une a los residuos $\beta 1-4$ -galactosa expuestos de la superficie de las plaquetas. Como control positivo para la desialación de plaquetas, se añadió $\alpha 2-3,6,8$ neuraminidasa de *C. perfringens* (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (60 min, 37 ° C) para eliminar el ácido siálico terminal (Jansen *et al*, 2012). Los resultados se muestran como ratio entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la muestra problema (plaquetas del paciente con PTI y suero normal, o plaquetas control sanas y suero de paciente PTI) frente a plaquetas de controles sanos incubadas con suero control. En cada test, se adquirieron 10000 eventos de plaquetas y se analizaron en un FACSCalibur (BD Biosciences).

2.4. Niveles séricos de trombopoyetina

Los niveles de TPO circulante se midieron en muestras de suero de pacientes con PTI usando un inmunoensayo comercial (Quantikine, "Human thrombopoietin Immunoassay" R & D Systems, Minneapolis, MN), basado en una técnica ELISA tipo sándwich, según el protocolo del fabricante. Además, se midieron los niveles de TPO en un grupo de cinco adultos sanos como grupo de control.

2.5. *Tratamiento con oseltamivir*

Oseltamivir, un inhibidor competitivo de la actividad de la enzima neuraminidasa, se investigó como una opción terapéutica potencial en pacientes con PTI multirefractaria. La decisión de tratamiento con este agente fue adoptada por los médicos que remitieron las muestras, quienes discutieron los problemas de seguridad relacionados con el uso de este producto con los pacientes y de manera individualizada consideraron o no apropiada la terapia. Un total de 10 pacientes con PTI multirefractaria recibieron 75 mg cada 12 horas vía oral del fármaco antiviral durante un mínimo de 5 días consecutivos. La duración final de la terapia con oseltamivir fue decisión del médico tratante. El seguimiento estandarizado incluyó un control regular de los recuentos de plaquetas durante al menos 3 meses después de la introducción de oseltamivir. La respuesta se definió de acuerdo con los criterios internacionales estandarizados (Rodeghiero *et al*, 2009). Tanto la ausencia de aumento en el recuento de plaquetas como la necesidad de terapia de rescate o el inicio de tratamientos adicionales para PTI durante el seguimiento de 3 meses fueron considerados como ausencia de respuesta (NR).

2.6. *Estudio de proteínas plasmáticas*

2.6.1. Western Blot (*Antitrombina, Factor XI*)

Para analizar las posibles diferencias en los grados de glicosilación en las proteínas plasmáticas circulantes debido a las variaciones en la composición de glicanos, las proteínas que se sabe que están altamente glicosiladas se evaluaron mediante inmunotransferencia de tipo Western. La electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) (PAGE) en condiciones desnaturalizadas (reductoras y no reductoras) se realizó en muestras de plasma citratado de 5 pacientes con PTI (4 multirefractarios y 1 control de PTI) y de un control sano. Además, una muestra de plasma de un control sano se trató con neuraminidasa de amplio espectro, como se describió previamente (Corral *et al*, 2004; Martinez-Martinez *et al*, 2010). Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno. La antitrombina, una proteína con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación fue inmunomarcada con un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la antitrombina humana (Sigma-Aldrich Madrid, España), seguido de un anticuerpo de burro anti IgG-conejo conjugado con peroxidasa (GE Healthcare Pittsburgh, PA) y detección mediante un kit de ECL (Amersham Biosciences Piscataway, NJ). El Factor XI (FXI), que tiene cinco sitios potenciales de N-glicosilación, se inmunomarcó con anticuerpo policlonal anti-FXI humano de cabra (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN), seguido de un anticuerpo de conejo anti IgG-cabra conjugado con peroxidasa (A9452, Sigma-Aldrich).

2.6.2. HPLC (*Transferrina*)

Los defectos en la biosíntesis de las glicoproteínas generalmente se evalúan mediante el análisis del patrón anormal de N-glicanos unidos a la transferrina sérica. El análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las glicoformas de transferrina se realizó tal como se describe (de la Morena-Barrio *et*

al, 2016) en muestras de suero de 4 pacientes con PTI multirefractaria y dos controles sanos. Además, se incluyó una muestra de suero de un paciente con un trastorno congénito de glicosilación (CDG) causado por mutaciones en PMM2, una enzima involucrada en la actividad de fosfomanomutasa-2 (PMM2-CDG) como control positivo de la disminución del contenido de ácido siálico en proteínas plasmáticas (de la Morena-Barrio *et al*, 2013). Brevemente, la transferrina se saturó completamente con hierro mezclando 100 μ l de plasma con 20 μ l de FeNTA (1,67 mM). A continuación, las lipoproteínas en la muestra se precipitaron mediante la adición de 20 μ L de sulfato de dextrano al 10%, CaCl₂ 1 mM durante 60 min a 4 ° C, y luego se centrifugó a 3500 g a 4 ° C durante 5 min. Luego, 130 μ L del sobrenadante fueron retirados y concentrados a 3500g a 4 ° C en un filtro YM-10 Microcon (Millipore), diluidos con 260 μ L de agua y transferidos a viales de HPLC de vidrio, e inyectados (100 μ L) en el sistema de HPLC (Cromatografía Líquida Agilent Serie 1100, Agilent Technologies). La separación se realizó en una columna de cromatografía de intercambio de aniones SOURCE® 15Q PE 4.6 / 100 (Amersham Biosciences) a 22 ° C, mediante elución en gradiente lineal de sal a un caudal de 1,0 ml / min. La cuantificación de las glicoformas de transferrina se basó en la absorbancia selectiva del complejo hierro-transferrina a 470 nm. La cantidad relativa de cada glicoforma se calculó como un porcentaje del área bajo la curva, utilizando la integración de referencia.

2.7. Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS v.21 para el análisis estadístico. Los datos de medición de distribución sesgada se presentan como M (min, max), en los cuales M representa la mediana, min y max representa el rango. Las medias también se

dan en los datos mostrados como gráficos de puntos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se evaluaron mediante pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney y Chi-Cuadrado). Un valor p de menos de 0,05 se consideró significativo.

3. Resultados

Se incluyeron un total de 35 pacientes con PTI primaria (16 multirefractarios y 19 pacientes que mostraron respuestas a terapias tradicionales) y 31 adultos sanos como controles. Todos los pacientes multirefractarios habían sido tratados previamente con glucocorticosteroides y TPO-RA sin respuesta. Ninguno de los pacientes multirefractarios que había recibido rituximab, o tratamientos inmunosupresores/inmunomoduladores habían respondido, y los que se habían sometido a esplenectomía no mostraron aumentos en los recuentos de plaquetas o presentaron recaída después de la intervención quirúrgica. Sólo 2 de los 13 pacientes que recibieron IGIV presentaron respuestas leves y cortas. Los pacientes multirefractarios no fueron diferentes de los pacientes con PTI control atendiendo a la edad, sexo, duración de PTI, tratamientos previos con glucocorticoides o TPO-RA, ni en el estado de esplenectomía. Un número significativamente mayor de pacientes multirefractarios se había tratado con inmunosupresores/inmunomoduladores, rituximab e IGIV en comparación con los pacientes con PTI control ($p < 0,05$). Las características pretratamiento y también las terapias en el momento de la recogida de muestras de ambos grupos de pacientes con PTI se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con PTI; tratamientos previos y tratamiento en el momento de la recolección de las muestras

	Pacientes con PTI multirefractaria (n=16)	Pacientes con PTI control (n=19)	<i>p</i>
Edad; mediana (rango)	48 (5-79)	31 (2-71)	p=0,267
Sexo femenino, n (%)	8 (50,0)	8 (42,1)	p=0,640
PTI crónica, n (%)	12 (75,0)	15 (78,9)	p=0,782
Tratamientos previos			
Glucocorticoides, n (%)	16 (100)	18 (94,7)	p=0,352
IGIV, n (%)	13 (81,3)	8 (42,1)	p=0,019
Esplenectomía, n (%)	6 (37,5)	9 (47,4)	p=0,557
TPO-RA, n (%)	16 (100)	18 (94,7)	p=0,352
Inmunosupresores/ inmunomoduladores, n (%)	11 (68,8)	4 (21,1)	p=0,005
Rituximab, n (%)	10 (62,5)	3 (15,8)	p=0,004
Tratamientos en el momento de la recogida de muestras			
Glucocorticoides, n (%)	4 (25,0)	3 (15,8)	p=0,497
IGIV, n (%)	6 (37,5)	6 (31,6)	p=0,713
TPO-RA, n (%)	7 (43,8)	11 (57,9)	p=0,404
Inmunosupresores, n (%)	4 (25,0)	1 (5,3)	p=0,096
Sin tratamiento, n (%)	5 (31,3)	4 (21,1)	p=0,492

Abreviaturas: IGIV, inmunoglobulinas intravenosas; TPO-RA, agonistas del receptor de la trombopoyetina.

3.1. Especificidad de anticuerpos antiplaquetarios

Se analizó la relación entre los anticuerpos específicos de GP y las características clínicas. Usando el ensayo MACE, se detectaron anticuerpos antiplaquetarios séricos en 16 de 35 pacientes con PTI (45,7%). Los anticuerpos reactivos solo con $\alpha\text{IIb}\beta_3$ o GPIb α se detectaron en 4 y 7 pacientes, respectivamente.

Cinco pacientes tenían anticuerpos contra ambos receptores. Se identificó anti GPIb α en

5 pacientes con PTI multirefractaria (31,3%) y solo en dos pacientes en el grupo de PTI control (10,5%) (Tabla 2). Estos dos pacientes no mostraron incrementos de plaquetas con terapias relacionadas con aclaramiento de plaquetas dependiente de (FcγR), pero lograron respuestas completas (RC) con TPO-RA (administrado solo, n= 1; en combinación con tratamiento inmunosupresor, n= 1)

3.2. Caracterización biológica de pacientes con PTI multirefractaria

Los pacientes con PTI multirefractaria presentaron recuentos de plaquetas más bajos. Para determinar si las plaquetas de los pacientes con PTI multirefractaria eran intrínsecamente diferentes de los pacientes con PTI control en términos de activación y desialilación, las plaquetas lavadas de los pacientes se incubaron con sueros de un control normal. Los pacientes que cumplieron los criterios de multirefractariedad mostraron un tamaño plaquetario medio (FSC) significativamente mayor, así como una mayor secreción de alfa (CD62) y gránulos densos-lisosomas (CD63) en comparación con los pacientes con PTI control. Entre los pacientes multirefractarios, el nivel de desialilación fue marcadamente más alto que en el grupo de PTI control (Tabla 2).

Tabla 2. Características biológicas de los pacientes con PTI multirefractaria y PTI control

	PTI multirefractaria (n= 16)	PTI control (n= 19)	<i>p</i>
Recuento de plaquetas (x 10⁹/L); mediana (rango)	6,5 (0-26)	124 (14-545)	p<0,001
Plaquetas de los pacientes			
• FSC	1,82 (0,91-5,48)	1,21 (0,68-1,83)	p=0,030
• CD62	2,87 (0,40-13,03)	1,43 (0,31-10,75)	p=0,048
• CD63	4,90 (0,43-10,01)	1,68 (0,45-14,45)	p=0,005
• RCA-1	2,86 (1,01-9,79)	1,03 (0,36-2,63)	p<0,001
Suero de los pacientes			
• CD62	1,79 (0,73-13,70)	1,01 (0,09-10,86)	p=0,026
• RCA-1	1,48 (0,88-6,35)	0,94 (0,26-2,53)	p=0,014
• GPIbα	0,76 (0,48-1,18)	0,90 (0,66-1,67)	p=0,039
Especificidad de anticuerpo, n (%)			
• αIIbβ3 único	2 (12,5)	2 (10,5)	p=0,855
• GPIbα único	5 (31,3)	2 (10,5)	p=0,127
• Doble positivo	2 (12,5)	3 (15,8)	p=0,782
• Doble negativo	7 (43,8)	12 (63,2)	p=0,251

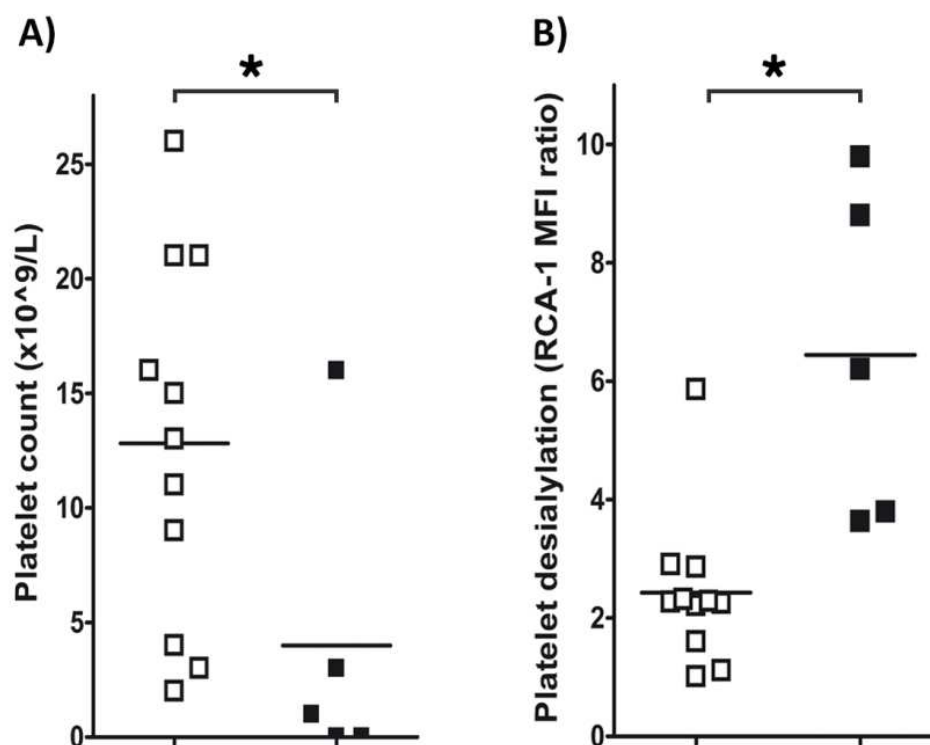
Los datos de citometría de flujo de plaquetas del paciente se refieren a la relación entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las plaquetas del paciente y el suero normal frente a las plaquetas de control sanos incubadas con suero de controles sanos. Los datos de citometría de flujo de sueros de pacientes se refieren a la ratio de IFM de plaquetas de controles sanos y suero de paciente frente a plaquetas de control incubadas con suero de control. Los resultados de citometría de flujo se dan como mediana y rango.

Para analizar si los pacientes multirrefractarios presentaban componentes solubles específicos que pudieran afectar la activación y desialilación de plaquetas, las plaquetas lavadas de adultos sanos se incubaron con sueros de pacientes. Se encontró que los sueros de pacientes con PTI multirefractaria, contrariamente a los de PTI

control, inducían una activación plaquetaria significativa (expresión de P-selectina y granulofisina), y una unión disminuida de un mAb que reconoce GPIb α . La desialilación de las plaquetas también se evaluó, y se observó una mayor pérdida de ácido siálico con los sueros de pacientes con PTI multirefractaria (Tabla 2).

En el grupo de 16 pacientes con PTI multirefractaria, la presencia de un anticuerpo anti-GPIb α (n= 5) se correlacionó con un recuento plaquetario más bajo y una mayor desialilación plaquetaria en comparación con pacientes con un patrón diferente de autoanticuerpos (n= 11) ($1 \times 10^9/L$ [0-16 $\times 10^9/L$] vs. $13 \times 10^9/L$ [2-26 $\times 10^9/L$]; $p = 0,037$; y la mediana de la relación IFM RCA-1 de 6,30 [3,63-9,79] vs. 2,27 [1,01-5,86], $p = 0,011$, respectivamente) (Figura 1).

Figura 1. Recuento de plaquetas (A) y nivel de desialilación (B) de pacientes con PTI multirefractaria en función de la especificidad de anticuerpos antiplaquetarios.



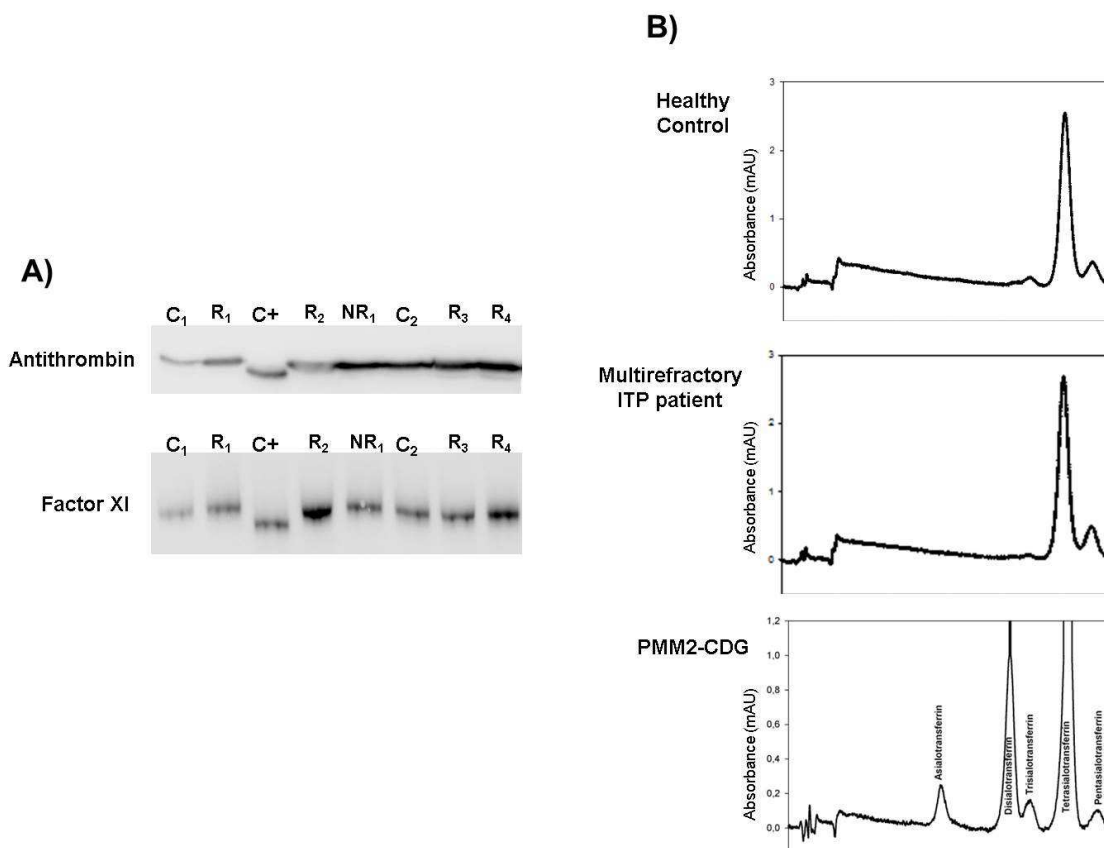
Los pacientes con PTI multirefractaria con positividad única de GPIb α (cuadrados negros, n= 5) y los pacientes con PTI multirefractaria con un patrón de autoanticuerpo diferente (cuadrados blancos, n= 11) mostraron diferencias significativas en los recuentos de plaquetas ($p = 0,037$) y desialilación de plaquetas medidos por RCA-1 ($p = 0,011$). Los datos de citometría de flujo con respecto a las plaquetas del paciente se refieren a la relación entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las plaquetas del paciente y el suero normal frente a las plaquetas de control incubadas con suero control. Las líneas horizontales representan las medias.

3.3. Desialilación de proteínas hepáticas

Para evaluar si el aumento de la desialilación que se había observado en las plaquetas de pacientes multirrefractarios también podría afectar las proteínas circulantes, las glicoformas hiposialiladas de diferentes proteínas plasmáticas se

evaluaron por análisis electroforético y de transferencia (Western), así como por HPLC. Como la N-glicosilación es una modificación postraducciona del tamaño de la antitrombina, la presencia de una molécula de antitrombina más pequeña sería consistente con una alteración en la glicosilación, como la observada por la adición *in vitro* de neuraminidasa en el plasma control (Figura 2A). Sin embargo, se observó una movilidad similar de esta proteína en pacientes con PTI multirefractaria, PTI control y en controles sanos. No se identificaron defectos de glicosilación cuando se evaluaron otras proteínas plasmáticas hemostáticas (FXI) en pacientes multirefractarios (Figura 2A). De acuerdo con estos resultados, el análisis más sensible de las glicoformas de transferrina mediante HPLC no reveló un aumento significativo de las formas hiposializadas en pacientes con PTI multirefractaria a diferencia del patrón típico en un paciente con un defecto congénito de glicosilación (aumento de asialo y disialotransferrina) (Figura 2B).

Figura 2. Análisis del nivel de sialilación en proteínas hepáticas



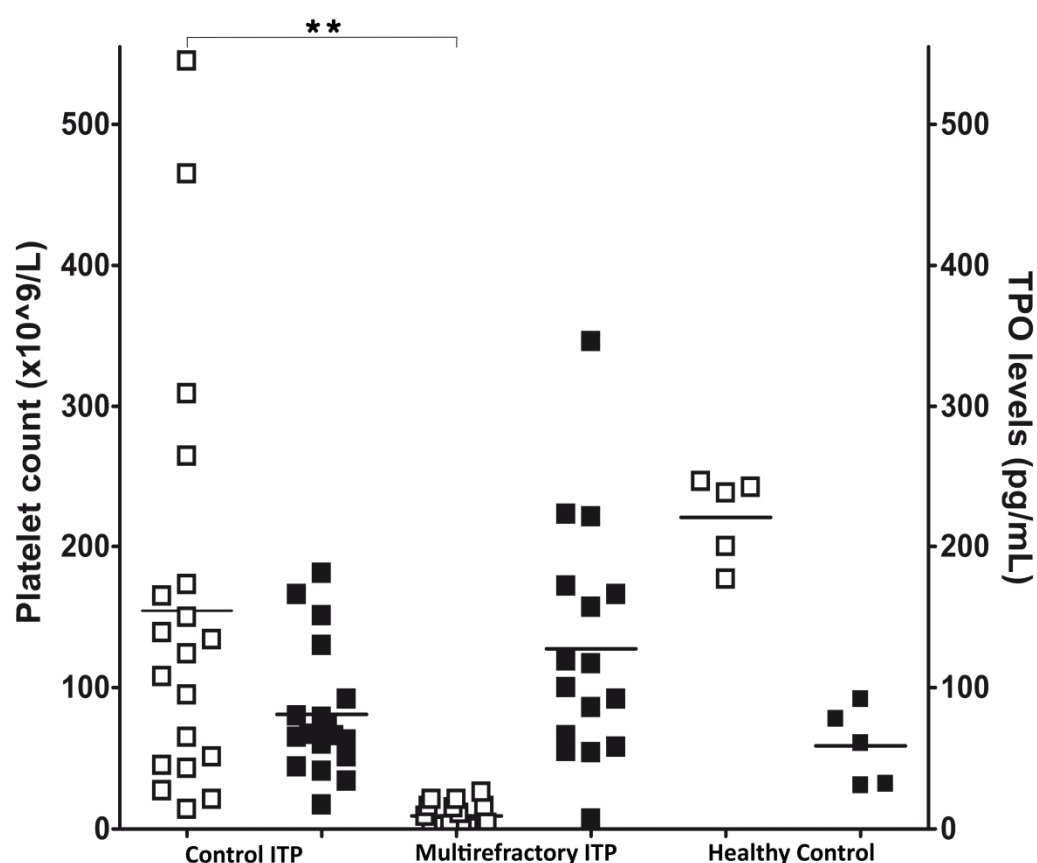
En A se muestra el patrón electroforético de antitrombina plasmática (condiciones reducidas de SDS-PAGE) y factor XI (condiciones no reducidas) en 4 pacientes con PTI multirefractaria (R), en 1 paciente con PTI control, no refractario (NR) y dos controles sanos (C). Como control positivo (C+) se incluyó el plasma de un control normal tratado con una neuraminidasa de amplio espectro, una enzima que libera los ácidos siálicos terminales de la porción de N-glicano. En B se muestra un análisis representativo de HPLC (transferrina) de un paciente con PTI multirefractaria y un control sano. Como control positivo de los defectos de N-glicosilación de las proteínas hepáticas, se incluyó una muestra de un paciente con un defecto congénito de glicosilación (PMM2-CDG).

3.4. Niveles séricos de trombopoyetina en pacientes multirefractarios

Las concentraciones de TPO en pacientes multirefractarios tendieron a ser más altas que en los pacientes con PTI control ($P=0,076$) y que en controles sanos ($P=0,063$) (Figura 3). Cuando se consideran solo pacientes con un recuento de plaquetas

$<50 \times 10^9/L$, el nivel medio de TPO en pacientes multirrefractarios fue 1,6 veces mayor que en pacientes con trombocitopenia que habían mostrado respuestas a terapias anteriores (108 vs 66 pg / ml, $P= 0,090$). Vale la pena señalar que en el grupo de pacientes con PTI multirrefractaria, las concentraciones iniciales de TPO fueron similares independientemente de la especificidad del anticuerpo (100 pg / ml en pacientes con anticuerpos detectables anti GPIb α vs 118 pg / ml en aquellos con diferente perfil de anticuerpos, $P= 0,713$).

Figura 3. Niveles de trombopoyetina (TPO) y recuentos plaquetarios de pacientes con PTI multirrefractaria, PTI controles e individuos sanos



Recuento de plaquetas ($\times 10^9/L$, cuadrados blancos) y TPO sérica (pg/ml, cuadrados negros) en pacientes con PTI multirrefractaria ($n= 16$), no refractarios (control ITP, $n= 19$) y controles sanos ($n= 5$). Las líneas horizontales representan valores medios.

3.5. Respuesta a oseltamivir

Teniendo en cuenta que la desialilación puede causar una mayor eliminación de plaquetas de la circulación y que la inhibición de sialidasa podría proporcionar una opción de tratamiento para pacientes con trombocitopenia que no responde a los regímenes de tratamiento actuales, un total de 10 pacientes con PTI multirefractaria recibieron oseltamivir a criterio del médico remitente. Un paciente fue categorizado como PTI de nuevo diagnóstico, dos como PTI persistente, mientras que los siete restantes tenían PTI crónica. Estos diez pacientes habían recibido una mediana de seis tratamientos médicos diferentes sin incrementos en los recuentos de plaquetas, ocho no habían mostrado respuesta a los dos TPO-RA administrados a la dosis máxima aprobada, y dos habían recibido solo uno de ellos. La Tabla 3 resume las características de los pacientes. Antes del tratamiento, en todos los casos el perfil biológico había evidenciado una notable pérdida de plaquetas de los ácidos siálicos terminales de las plaquetas (Tabla 4). Los pacientes recibieron oseltamivir a dosis de 75 mg dos veces al día. La duración de la terapia con oseltamivir y la combinación con terapias adicionales para PTI variaron entre los pacientes a criterio del médico tratante. Cuatro de los 10 pacientes lograron una respuesta. Cuando el fármaco antiviral se administró en monoterapia (n= 4), ninguno de los pacientes logró un aumento en los recuentos de plaquetas. Sin embargo, la combinación de oseltamivir con otras terapias (n= 6) fue eficaz con una tasa de respuesta global del 66,7% (3 CR, 1 R). Sorprendentemente, tres de los cuatro pacientes que respondieron al oseltamivir habían recibido tratamiento combinado con TPO-RA y un inmunosupresor previamente, sin mostrar incrementos de plaquetas. Además, ninguno de estos cuatro pacientes había logrado previamente respuestas a la terapia estándar que se agregó al oseltamivir (TPO-RA [n = 1], TPO-RA

y corticoides [n = 1], TPO-RA y azatioprina [n= 1], o azatioprina [n= 1]). Las respuestas al agente antiviral se observaron temprano después del inicio del tratamiento (mediana de 18 días [5-42]) y la mediana de duración bajo tratamiento antiviral (75 mg dos veces al día) fue de 17 días (5-120). Se mantuvo una respuesta sostenida tras la interrupción del oseltamivir en los 4 pacientes (un caso libre de cualquier terapia para PTI en el momento actual), con una media de seguimiento de 450 días (120-630) (Tabla 3). De manera notable, en los 4 respondedores al oseltamivir, se detectó un anticuerpo con positividad única frente a GPIb α . En estos pacientes, hubo una tendencia hacia un mayor nivel de desialilación en comparación con los 6 pacientes que no mostraron incrementos en el recuento de plaquetas después de la terapia antiviral (ratio IFM RCA-1 de 5,00 [3,63-9,79] vs. 2,60 [2,21-8,80], P= 0,136) (Tabla 4).

Tabla 3. Características de los pacientes en tratamiento con oseltamivir, tratamiento individual y respuestas

Paciente	Edad (años) /Sexo	Tiempo desde diagnóstico PTI (meses)	Tratamientos previos	Terapia estándar administrada en combinación con oseltamivir	Dosis y duración del tratamiento con oseltamivir	Respuesta	Tiempo hasta respuesta (días)	Respuesta mantenida tras discontinuación	Seguimiento (meses)	Tratamiento actual y respuesta
Oseltamivir en combinación con terapia estándar										
1	32/F	2	IVIG, CST, ETPG, RTXb, ROM, IVIG, rFVIIa, transfusion plaquetas	ROM (8 µg/kg dosis máxima)	75 mg/12h durante 4 meses	RC	25	Si	21	Ninguno (RC)
2	67/F	60	CST, IVIG, VC, AZA, TPO-ra, MMF, CsA, RTXb, DZ, Esplenectomía	AZA 50 mg/8h	75 mg/12h durante 5 días	RC	5	Si	20	AZA 50 mg/12h (RC)
3	73/F	7	PRD, ROM, AZA	ROM (8,6 µg/kg dosis máxima)+AZA 50 mg/day	75 mg/12h (14 días) →75 mg dos veces a semana (12 meses)	RC	12	Si	14	MMF 500 mg/12h, ROM (1 µg/kg) (RC)
4	6/M	5	IVIG, CST, ETPG, ROM	ROM (10 µg/kg) + PRD 1 mg/kg 4 días. Después, ROM + DX 4 mg/12h 3 días.	75 mg/12h durante 21 días	R	42	Si	4	ROM (10µg/kg) (R)
5*	5/M	33	IVIG, CST, ROM, DP,ETPG	ETPG (75 mg/day)	75 mg/12h durante 5 días	NR	--	--	9	Esplenectomía (NR)
6	79/F	240	CST, DZ, IVIG, ROM, AZA,	PRD 20 mg/d +	75 mg/12h	NR	--	--	20	IVIG (NR)

			ETPG, RTXB, VC	IVIG 1 gr/kg	durante 5 días					
Oseltamivir en monoterapia										
7	49/F	66	IVIG, CST, RTXB, ROM, ETPG, DP	--	75 mg/12h durante 5 días	NR	--	--	24	MMF (NR), Fostamatinib (NR)
8	78/M	52	PRD, DX, IVIG, AZA, VC, RTXB, ETPG	--	75 mg/12h durante 5 días	NR	--	--	24	AZA + PRD± IVIG (R)
9	50/M	120	CST, IVIG, ROM, ETPG, RTXB	--	75 mg/12h durante 90 días	NR	--	--	11	AZA (NR)
10	53/M	144	DX, Splenectomy, ETPG, ROM, AZA, DZ	--	75 mg/12h durante 90 días	NR	--	--	6	ETPG (NR)

Abreviaturas: AZA, azatioprina; CsA, ciclosporina; RC, respuesta completa; CST, corticoides; DP, dapsona; DX, dexametasona; DZ, danazol; ETPG, eltrombopag; IVIG, inmunoglobulina intravenosa; MMF, micofenolato mofetilo; NR, sin respuesta; PRD, prednisona; R, respuesta; ROM, romiplostim; RTXB, rituximab; VC, vincristina.

* No se identificaron variantes patológicas relacionadas con trastornos plaquetarios hereditarios mediante secuenciación de alto rendimiento (Lozano *et al*, 2016).

Tabla 4. Características biológicas de los pacientes en función de su respuesta o no a oseltamivir

Paciente	Especificidad del autoanticuerpo antiplaqueta	Nivel TPO (pg/mL)	Recuento plaquetas antes/después oseltamivir ($\times 10^9/L$)	FSC	CD63	RCA-1	CD62
Respuesta a oseltamivir							
1	GPIb α	346	0/101	5,48	NA	6,20	NA
2	GPIb α	223	3/134	1,78	3,89	3,79	8,88
3	GPIb α	100	16/120	1,02	4,59	3,63	2,87
4	GPIb α	58	0/51	2,12	5,88	9,79	3,05
No respuesta a oseltamivir							
5	ND	86	26/19	0,98	10,01	5,86	13,03
6	α IIb β 3	7	16/13	1,04	5,21	2,90	8,03
7	α IIb β 3 + GPIb α	166	4/4	2,92	NA	2,28	2,21
8	α IIb β 3	92	3/8	1,77	7,57	2,31	3,66
9	GPIb α	66	1/3	1,85	6,93	8,80	8,36
10	ND	54	2/2	1,02	2,80	2,21	2,32
Los datos de citometría de flujo se refieren al ratio entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las plaquetas del paciente y el suero normal frente a las plaquetas de control incubadas con suero control. Abreviaturas: NA, no analizado; ND, indetectable							

4. Discusión

En general, este estudio muestra que los pacientes con PTI sin respuesta no solo a terapias dirigidas a los mecanismos de aclaramiento de plaquetas dependientes de $Fc\gamma R$, sino también refractarios a los TPO-RA, tienen un mayor estado de activación y desialilación plaquetaria que puede estar relacionado con la especificidad del anticuerpo antiplaquetario. Este trabajo también demuestra que el oseltamivir, en combinación con el tratamiento estándar para PTI, puede considerarse un enfoque terapéutico prometedor para mejorar la trombocitopenia, específicamente en pacientes que presentan PTI multirefractaria en presencia de anticuerpos anti-GPIIb/IIIa. Como no evaluamos la presencia de autoanticuerpos plaquetarios específicos para glicoproteínas distintas de $\alpha II_b\beta_3$ o GPIIb/IIIa, no puede ser descartado el posible efecto de anticuerpos que reconocen epítomos en otros receptores (como $\alpha_2\beta_1$ o GPVI) en la activación y desialilación de plaquetas humanas.

Previamente, experimentos *in vitro* han demostrado que el plasma de pacientes con PTI que contiene anticuerpos anti-GPIIb/IIIa induce una expresión significativa de P-selectina y desialilación de las plaquetas de control, mientras que el plasma de pacientes con PTI anti- $\alpha II_b\beta_3$ provoca cambios moderados (Li *et al*, 2015). En nuestros pacientes con PTI multirefractaria los anticuerpos contra GPIIb/IIIa estaban sobrerrepresentados en comparación con los pacientes con PTI control. Sin embargo, en algunos de los casos graves de PTI refractarias, sólo se detectaron anticuerpos dirigidos a $\alpha II_b\beta_3$. De manera similar, los anticuerpos anti-GPIIb/IIIa también se detectaron en el grupo de casos no refractarios, lo que implica que individualmente no todos los anticuerpos anti-GPIIb/IIIa inducen el mismo grado de efectos clínicos y biológicos, sino que puede ser consecuencia de diferentes epítomos diana, o también del título de anticuerpos. Se

encontró que el grupo de pacientes con PTI multirefractaria tenía más activación plaquetaria, con diferencias significativas en el tamaño de las plaquetas, la degranulación y también una disminución en el contenido de membrana de GPIb α por citometría. Este último hallazgo probablemente pueda explicarse por una inhibición competitiva del receptor GPIb α por los anticuerpos anti-GPIb α (Li *et al*, 2014) o por la internalización del receptor en respuesta a la activación plaquetaria (Han *et al*, 2003) desencadenada por anticuerpos anti-GPIb α . Estudios previos han demostrado que el tamaño de las plaquetas podría servir como un marcador sustitutivo para las plaquetas reticuladas, además de ser un predictor independiente de la función plaquetaria (Guthikonda *et al*, 2008; Mangalpally *et al*, 2010), y respalda la hipótesis de que en los pacientes con PTI multirefractaria una mayor proporción de plaquetas jóvenes y grandes podría indicar un mayor aclaramiento plaquetario en comparación con los pacientes con PTI control.

El contenido de ácido siálico de las glicoproteínas plaquetarias tiene un impacto significativo en el desarrollo de trombocitopenia en diferentes condiciones. El proceso natural de activación del AMR en la sepsis refleja una respuesta biológica que ha evolucionado durante millones de años de evolución para preservar a las especies del excesivo daño y muerte tisular. Mientras que el AMR protege al huésped de una coagulación intravascular diseminada reduciendo el número de plaquetas circulantes que han sido remodeladas por la actividad neuraminidasa del patógeno (sialidasa), cuando aumenta la carga de patógenos la respuesta puede volverse inadecuada y las plaquetas se consumen, desembocando en hemorragia con riesgo vital (Grewal *et al*, 2013).

En este estudio, demostramos que la desialilación plaquetaria aumenta

significativamente en pacientes con PTI multirefractaria en comparación con aquellos que responden a terapias tradicionales. Recientemente se ha descrito que los niveles más altos de desialilación de las plaquetas se correlacionan con la falta de respuesta a los tratamientos de primera línea para PTI (Tao *et al*, 2017). En nuestro estudio, demostramos que la desialilación plaquetaria aumenta significativamente no solo en pacientes que no responden a los enfoques tradicionales que se dirigen a disminuir el aclaramiento en el RES, sino también en aquellos que no muestran respuesta plaquetaria a los TPO-RA. Estos hallazgos sugieren que la desialilación de las plaquetas podría ser un biomarcador útil para determinar el resultado terapéutico de los pacientes con PTI. Actualmente, no existen predictores clínicos o biológicos de respuesta a TPO-RA (Bussel *et al*, 2016; Newland *et al*, 2016), pero se ha sugerido que los niveles elevados de TPO en pacientes con PTI pueden predecir respuestas clínicas pobres (Makar *et al*, 2013). Este aumento no parece ser dependiente de los recuentos de plaquetas, ya que previamente se ha demostrado que los niveles de TPO disminuyen modestamente al aumentar el recuento de plaquetas debido al tratamiento (Makar *et al*, 2013). Concordante con tales datos, en comparación con el grupo de pacientes que respondieron, observamos que los pacientes con PTI multirefractaria que exhibían un aumento de desialilación plaquetaria, presentaron una tendencia hacia mayores concentraciones plasmáticas de TPO, que se mantuvo al considerar pacientes con bajos recuentos de plaquetas ($<50 \times 10^9/L$). Esto puede estar justificado por el hecho de que la eliminación de las plaquetas desialiladas circulantes a través del AMR estimula la producción de TPO a través de la señalización de JAK2-STAT3 (Grozovsky *et al*, 2015). Datos recientes indican que el extremo N-terminal de GPIIb α es un requisito previo para la transcripción y producción de ARNm de TPO hepática mediada por plaquetas, con implicaciones en enfermedades relacionadas con GPIIb α , como el

síndrome de Bernard Soulier y trombocitopenias auto y aloinmunes (Xu *et al*, 2018). En ese sentido, los anticuerpos que se unen a la porción extracelular de GPIb α pueden jugar un papel bivalente en el fino equilibrio para la homeostasis de TPO: favorecer su producción al provocar una desialilación plaquetaria significativa de la GPIb α plaquetaria, pero también perjudicar la generación de TPO cuando se dirige a la región N-terminal del receptor. Los pacientes con PTI multirefractaria tienen un pronóstico particularmente precario y las terapias estándar son limitadas (Mahévas *et al*, 2016). Oseltamivir, también conocido como Tamiflu, es un fármaco contra la gripe ampliamente utilizado y clínicamente eficaz. Es un inhibidor de la sialidasa viral que previene la liberación de viriones de la progenie, lo que limita la propagación de la infección (Liao *et al*, 2017). Varios estudios indican la posibilidad de tratamiento de la trombocitopenia asociada a infección con oseltamivir. Oseltamivir podría elevar los recuentos de plaquetas en el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos con trombocitopenia (Jansen *et al*, 2015; Moore *et al*, 2007), un efecto que parece ser independiente del diagnóstico microbiológico de influenza (Jansen *et al*, 2015). Además, se ha demostrado que este agente inhibe la actividad de desialilación en la superficie de las plaquetas y posteriormente disminuye la fagocitosis de las plaquetas en la trombocitopenia aislada prolongada después del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Zhang *et al*, 2015), acorta significativamente el tiempo de recuperación de plaquetas y reduce la transfusión de plaquetas en pacientes con sepsis (Li *et al*, 2017). La desialilación se ha correlacionado no solo con el aumento de la fagocitosis plaquetaria, sino también con la apoptosis relacionada con la redistribución de la proteína 14-3-3 ζ asociada a GPIb α (Zhang *et al*, 2015). Nuestro estudio piloto muestra las notables buenas respuestas al oseltamivir en pacientes multirefractarios con una tasa de respuesta global del 40%. Cuando el fármaco antiviral se combinó con TPO-

RA o con fármacos inmunosupresores, la efectividad del tratamiento aumentó al 66,7%. Una interpretación es que mientras que el oseltamivir, un medicamento con un perfil de seguridad relativamente bueno, puede contribuir a amortiguar el aclaramiento de plaquetas independiente de FcR y la apoptosis, pueden ser necesarios tratamientos adicionales para aumentar la producción de plaquetas (ya sea por TPO-RA o por terapia inmunosupresora que puede disminuir el sistema autoinmune patológico). Se deben tener en cuenta ciertas limitaciones con respecto a este estudio. La primera se refiere a la heterogeneidad en términos de terapias estándar combinadas con oseltamivir, así como a la duración del tratamiento. Hasta la fecha, los mecanismos implicados en el aumento sostenido de las plaquetas después del tratamiento con oseltamivir, así como el mejor esquema de tratamiento no se conocen por completo. En la literatura, hay tres casos publicados con elevación del recuento de plaquetas en pacientes con PTI tratados con oseltamivir 75 mg dos veces al día durante solo 5 días, con respuestas plaquetarias sostenidas observadas durante 11 (Bigot *et al*, 2016), 16 días (Alioglu *et al*, 2010) y 6 meses (Shao *et al*, 2015). En el cuarto caso publicado, el recuento de plaquetas solo aumentó después del tratamiento simultáneo de oseltamivir y TPO-RA, y el tratamiento de combinación se administró durante 2 meses (Álvarez-Román *et al*, 2016). Además, hasta ahora este tratamiento debe considerarse experimental y no está libre de eventos adversos. Se ha notificado que el oseltamivir aumenta el riesgo de náuseas, vómitos, y eventos psiquiátricos en adultos (Heneghan *et al*, 2016). Por lo tanto, en los pacientes con PTI que no responden a las terapias disponibles, se debe considerar el balance entre los beneficios y los riesgos al tomar decisiones sobre el tratamiento con agentes nuevos. Si bien estos datos resaltan la presunta relación entre las PTI multirefractarias y el contenido de ácido siálico de las plaquetas, es necesario realizar estudios prospectivos en grandes cohortes de pacientes con PTI y se necesita más investigación para evaluar

mejor el efecto del oseltamivir en este contexto.

5. Conclusión

En resumen, este estudio sugiere que la desialilación plaquetaria contribuye a la patogénesis de la PTI multirefractaria y propone nuevas herramientas de diagnóstico y contrataque para el tratamiento de la trombocitopenia en estos pacientes. La identificación de predictores de multirefractariedad a los tratamientos ayudaría a implementar nuevas terapias y evitar ciertos enfoques terapéuticos que pueden ser costosos, limitados y con importantes efectos secundarios. Los pacientes con PTI con positividad única para anticuerpos anti-GPIIb/IIIa y que presentan una marcada desialilación plaquetaria pueden identificarse como probables no respondedores a los tratamientos convencionales. Se espera que el análisis más amplio de la población de pacientes confirme si un abordaje individual con una combinación de inhibidores de sialidasa en pacientes con desialilación plaquetaria significativa pudiera representar una estrategia para el tratamiento de pacientes con PTI multirefractaria.

6. Referencias

- Alioglu, B., Tasar, A., Ozen, C., Selver, B. & Dallar, Y. (2010) An experience of oseltamivir phosphate (tamifluTM) in a pediatric patient with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a case report. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, **37**, 55–8.
- Álvarez-Román, M.T., Rivas Pollmar, M.I., Bernardino, J.I., Lozano, M.L., Martín-Salces, M., Fernández-Bello, I., Jiménez-Yuste, V. & Butta, N. V (2016) Thrombopoietin receptor agonists in conjunction with oseltamivir for immune thrombocytopenia. *AIDS (London, England)*, **30**, 1141–2.
- Barsam, S.J., Psaila, B., Forestier, M., Page, L.K., Sloane, P.A., Geyer, J.T., Villarica, G.O., Ruisi, M.M., Gernsheimer, T.B., Beer, J.H. & Bussel, J.B. (2011) Platelet production and platelet destruction: assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. *Blood*, **117**, 5723–32.
- Bigot, P., Auffret, M., Gautier, S., Weinborn, M., Ettahar, N.-K. & Coupé, P. (2016) Unexpected platelets elevation in a patient with idiopathic thrombocytopenia treated with oseltamivir for influenza infection. *Fundamental & clinical pharmacology*, **30**, 483–5.
- Bussel, J.B., Wang, X., Lopez, A. & Eisen, M. (2016) Case study of remission in adults with immune thrombocytopenia following cessation of treatment with the thrombopoietin mimetic romiplostim. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, **21**, 257–62.
- Chang, M., Nakagawa, P.A., Williams, S.A., Schwartz, M.R., Imfeld, K.L., Buzby, J.S. & Nugent, D.J. (2003) Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro.

Blood, **102**, 887–95.

Cooper, N. (2017) State of the art - how I manage immune thrombocytopenia. *British journal of haematology*, **177**, 39–54.

Corral, J., Huntington, J.A., González-Conejero, R., Mushunje, A., Navarro, M., Marco, P., Vicente, V. & Carrell, R.W. (2004) Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **2**, 931–9.

Grewal, P.K., Aziz, P. V, Uchiyama, S., Rubio, G.R., Lardone, R.D., Le, D., Varki, N.M., Nizet, V. & Marth, J.D. (2013) Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 20218–23.

Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2015) The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nature medicine*, **21**, 47–54.

Guthikonda, S., Alviar, C.L., Vaduganathan, M., Arikan, M., Tellez, A., DeLao, T., Granada, J.F., Dong, J.-F., Kleiman, N.S. & Lev, E.I. (2008) Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **52**, 743–9.

Han, Y., Nurden, A., Combrié, R. & Pasquet, J.-M. (2003) Redistribution of glycoprotein Ib within platelets in response to protease-activated receptors 1 and 4: roles of cytoskeleton and calcium. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **1**, 2206–15.

- Heneghan, C.J., Onakpoya, I., Jones, M.A., Doshi, P., Del Mar, C.B., Hama, R., Thompson, M.J., Spencer, E.A., Mahtani, K.R., Nunan, D., Howick, J. & Jefferson, T. (2016) Neuraminidase inhibitors for influenza: a systematic review and meta-analysis of regulatory and mortality data. *Health technology assessment (Winchester, England)*, **20**, 1–242.
- Jansen, A.J.G., Josefsson, E.C., Rumjantseva, V., Liu, Q.P., Falet, H., Bergmeier, W., Cifuni, S.M., Sackstein, R., von Andrian, U.H., Wagner, D.D., Hartwig, J.H. & Hoffmeister, K.M. (2012) Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood*, **119**, 1263–73.
- Jansen, A.J.G., Peng, J., Zhao, H.-G., Hou, M. & Ni, H. (2015) Sialidase inhibition to increase platelet counts: A new treatment option for thrombocytopenia. *American journal of hematology*, **90**, E94-5.
- de la Morena-Barrio, M.E., Hernández-Caselles, T., Corral, J., García-López, R., Martínez-Martínez, I., Pérez-Dueñas, B., Altisent, C., Sevivas, T., Kristensen, S.R., Guillén-Navarro, E., Miñano, A., Vicente, V., Jaeken, J. & Lozano, M.L. (2013) GPI-anchor and GPI-anchored protein expression in PMM2-CDG patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **8**, 170.
- de la Morena-Barrio, M.E., Martínez-Martínez, I., de Cos, C., Wypasek, E., Roldán, V., Undas, A., van Scherpenzeel, M., Lefeber, D.J., Toderici, M., Sevivas, T., España, F., Jaeken, J., Corral, J. & Vicente, V. (2016) Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **14**, 1549–60.
- Li, J., Callum, J.L., Lin, Y., Zhou, Y., Zhu, G. & Ni, H. (2014) Severe platelet

- desialylation in a patient with glycoprotein Ib/IX antibody-mediated immune thrombocytopenia and fatal pulmonary hemorrhage. *Haematologica*, **99**, e61-3.
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M. & Ni, H. (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nature communications*, **6**, 7737.
- Li, M.-F., Li, X.-L., Fan, K.-L., Yu, Y.-Y., Gong, J., Geng, S.-Y., Liang, Y.-F., Huang, L., Qiu, J.-H., Tian, X.-H., Wang, W.-T., Zhang, X.-L., Yu, Q.-X., Zhang, Y.-F., Lin, P., Wang, L.-N., Li, X., Hou, M., Liu, L.-Y. & Peng, J. (2017) Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial. *Journal of hematology & oncology*, **10**, 104.
- Liao, L.E., Kowal, S., Cardenas, D.A. & Beauchemin, C.A.A. (2017) Exploring virus release as a bottleneck for the spread of influenza A virus infection in vitro and the implications for antiviral therapy with neuraminidase inhibitors. *PloS one*, **12**, e0183621.
- Liu, X.-G., Liu, S., Feng, Q., Liu, X.-N., Li, G.-S., Sheng, Z., Chen, P., Liu, Y., Wei, Y., Dong, X.-Y., Qin, P., Gao, C., Ma, C., Zhang, L., Hou, M. & Peng, J. (2016) Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP. *Blood*, **128**, 852–61.
- Lozano, M.L., Cook, A., Bastida, J.M., Paul, D.S., Irwin, G., Cid, A.R., Adan-Pedroso, R., Ramón González-Porras, J., Hernández-Rivas, J.M., Fletcher, S.J., Johnson, B., Morgan, N., Ferrer-Marin, F., Vicente, V., Sondek, J., Watson,

- S.P., Bergmeier, W. & Rivera, J. (2016) Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood*, **128**, 1282–9.
- Mahévas, M., Gerfaud-Valentin, M., Moulis, G., Terriou, L., Audia, S., Guenin, S., Le Guenno, G., Salles, G., Lambotte, O., Limal, N., Viallard, J.-F., Cheze, S., Tomowiak, C., Royer, B., Neel, A., Debouverie, O., Hot, A., Durieu, I., Perlat, A., Cliquennois, M., et al (2016) Characteristics, outcome, and response to therapy of multirefractory chronic immune thrombocytopenia. *Blood*, **128**, 1625–30.
- Makar, R.S., Zhukov, O.S., Sahud, M.A. & Kuter, D.J. (2013) Thrombopoietin levels in patients with disorders of platelet production: diagnostic potential and utility in predicting response to TPO receptor agonists. *American journal of hematology*, **88**, 1041–4.
- Mangalpally, K.K.R., Siqueiros-Garcia, A., Vaduganathan, M., Dong, J.-F., Kleiman, N.S. & Guthikonda, S. (2010) Platelet activation patterns in platelet size subpopulations: differential responses to aspirin in vitro. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, **30**, 251–62.
- Martinez-Martinez, I., Ordonez, A., Navarro-Fernandez, J., Perez-Lara, A., Gutierrez-Gallego, R., Giraldo, R., Martinez, C., Llop, E., Vicente, V. & Corral, J. (2010) Antithrombin Murcia (K241E) causing antithrombin deficiency: a possible role for altered glycosylation. *Haematologica*, **95**, 1358–1365.
- McMillan, R. (2000) The pathogenesis of chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Seminars in hematology*, **37**, 5–9.
- Menitove, J.E., Pereira, J., Hoffman, R., Anderson, T., Fried, W. & Aster, R.H.

- (1989) Cyclic thrombocytopenia of apparent autoimmune etiology. *Blood*, **73**, 1561–9.
- Moore, M.L., Chi, M.H., Zhou, W., Goleniewska, K., O’Neal, J.F., Higginbotham, J.N. & Peebles, R.S. (2007) Cutting Edge: Oseltamivir decreases T cell GM1 expression and inhibits clearance of respiratory syncytial virus: potential role of endogenous sialidase in antiviral immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **178**, 2651–4.
- Newland, A., Godeau, B., Priego, V., Viallard, J.-F., López Fernández, M.F., Orejudos, A. & Eisen, M. (2016) Remission and platelet responses with romiplostim in primary immune thrombocytopenia: final results from a phase 2 study. *British journal of haematology*, **172**, 262–73.
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Gessner, J.E. & Zirngibl, H. (2000) Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood*, **96**, 2520–7.
- Palandri, F., Polverelli, N., Catani, L., Sollazzo, D., Romano, M., Levorato, M. & Vianelli, N. (2014) The choice of second-line therapy in steroid-resistant immune thrombocytopenia: role of platelet kinetics in a single-centre long-term study. *American journal of hematology*, **89**, 1047–50.
- Peng, J., Ma, S.-H., Liu, J., Hou, Y., Liu, X.-M., Niu, T., Xu, R.-R., Guo, C.-S., Wang, X.-M., Cheng, Y.-F., Ni, H. & Hou, M. (2014) Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **12**, 497–504.
- Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., Michel, M., Provan, D., Arnold, D.M.,

- Bussel, J.B., Cines, D.B., Chong, B.H., Cooper, N., Godeau, B., Lechner, K., Mazzucconi, M.G., McMillan, R., Sanz, M.A., Imbach, P., Blanchette, V., Kühne, T., Ruggeri, M. & George, J.N. (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, **113**, 2386–93.
- Sarpatwari, A., Provan, D., Erqou, S., Sobnack, R., David Tai, F.W. & Newland, A.C. (2010) Autologous 111 In-labelled platelet sequestration studies in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) prior to splenectomy: a report from the United Kingdom ITP Registry. *British journal of haematology*, **151**, 477–87.
- Shao, L., Wu, Y., Zhou, H., Qin, P., Ni, H., Peng, J. & Hou, M. (2015) Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIb/IX autoantibody. *Platelets*, **26**, 495–7.
- Stasi, R. (2011) The stingy bone marrow and the wasteful peripheral blood: a tale of two ITPs. *Blood*, **117**, 5553–4.
- Tao, L., Zeng, Q., Li, J., Xu, M., Wang, J., Pan, Y., Wang, H., Tao, Q., Chen, Y., Peng, J., Hou, M., Jansen, A.J.G., Ni, H. & Zhai, Z. (2017) Platelet desialylation correlates with efficacy of first-line therapies for immune thrombocytopenia. *Journal of hematology & oncology*, **10**, 46.
- Webster, M.L., Sayeh, E., Crow, M., Chen, P., Nieswandt, B., Freedman, J. & Ni, H. (2006) Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIb/IIIa versus GPIb/alpha antibodies. *Blood*, **108**, 943–6.
- Xu, M., Li, J., Neves, M.A.D., Zhu, G., Carrim, N., Yu, R., Gupta, S., Marshall, J.,

- Rotstein, O., Peng, J., Hou, M., Kunishima, S., Ware, J., Branch, D.R., Lazarus, A., Ruggeri, Z.M., Freedman, J. & Ni, H. (2018) GPIb α is required for platelet-mediated hepatic thrombopoietin generation. *Blood*, blood-2017-12-820779.
- Yazdanbakhsh, K. (2016) TPO-RAs multitask in ITP. *Blood*, **128**, 750–1.
- Zeng, Q., Zhu, L., Tao, L., Bao, J., Yang, M., Simpson, E.K., Li, C., van der Wal, D.E., Chen, P., Spring, C.M., Wang, M., Zhang, L., Ruan, C., Hou, M., Xia, R. & Ni, H. (2012) Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GPIIb/IIIa versus GPIb α antibodies. *American journal of hematology*, **87**, 206–8.
- Zhang, X.-H., Wang, Q.-M., Zhang, J.-M., Feng, F.-E., Wang, F.-R., Chen, H., Zhang, Y.-Y., Chen, Y.-H., Han, W., Xu, L.-P., Liu, K.-Y. & Huang, X.-J. (2015) Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. *Journal of hematology & oncology*, **8**, 116.

Capítulo III

Papel del ácido siálico en el sistema hemostático:

resultados de un modelo *in vitro*.

1. Introducción

Los ácidos siálicos son monosacáridos ácidos derivados del ácido neuramínico que tras acetilación son incorporados a las proteínas (Li & Chen, 2012). La carga negativa asociada a estos ácidos terminales les confiere un papel relevante en la modulación de las interacciones proteína-proteína. Por tanto, variaciones en el contenido de ácido siálico, tanto por exceso como sobre todo por defecto, podrían afectar la función de las proteínas y tener consecuencias patológicas. Dentro de los defectos de sialilación, dos son las posibles causas de un menor contenido de ácido siálico en proteínas: 1) La disfunción de las sialiltransferasas implicadas en su incorporación. 2) La acción de sialidasas (también llamadas neuraminidasas) tanto endógenas como exógenas en la eliminación de los ácidos siálicos terminales.

Las proteínas del sistema hemostático (tanto proteínas de la coagulación como las proteínas de la superficie plaquetaria) son glicoproteínas, es decir, presentan un contenido elevado de ácido siálico. Sin embargo, pocos son los estudios que han evaluado el papel de la pérdida de este componente en la función del sistema hemostático, a pesar de que recientemente un número de trabajos ha descrito el posible papel de este azúcar en diferentes patologías que tienen como actores elementos del sistema hemostático.

Así, es bien conocido que la desialilación plaquetaria conlleva su aclaramiento; principalmente a través del receptor AMR. Las neuraminidasas que provocan desialilación de las glicoproteínas plaquetarias pueden ser exógenas, como la neuraminidasa A (NanA) del *Streptococcus pneumoniae* (Grewal *et al*, 2013) o endógenas, pudiendo estas últimas participar indirectamente en la regulación fisiológica de la trombopoyesis (Grozovsky *et al*, 2015). En este sentido, la

desialilación de las plaquetas causada por la sobreexpresión de NEU1 en las superficies de las plaquetas está implicada en: a) la trombopenia inmune a través de la unión a la plaqueta de anticuerpos con capacidad activadora, como se ha descrito previamente (Li *et al*, 2015) y ampliamente en el capítulo II de este trabajo; b) la apoptosis y fagocitosis de plaquetas en la trombopenia aislada prolongada postrasplante alogénico (Zhang *et al*, 2015); y c) en los contextos que cursan con una mayor unión del FvW, como se ha sugerido recientemente en la infección aguda por Dengue, un virus sin actividad neuraminidasa, pero que provoca la unión del FvW a las plaquetas desencadenando una traslocación de NEU1 a la membrana plaquetaria y produciendo la desialilación de estas (Riswari *et al*, 2019).

Asimismo, también se ha relacionado la desialilación de otras proteínas involucradas en la hemostasia con su vida media. Así, las formas desialiladas de diferentes proteínas hemostáticas se aclaran de la circulación tanto por interacciones a través del AMR, como a través de otros asialo-receptores, como el recientemente identificado en macrófagos (MGL) para el FvW (Ward *et al*, 2018).

Por todo ello, son necesarios estudios adicionales que evalúen el efecto global del ácido siálico en el sistema hemostático, no solo sobre una proteína aislada. El primer estudio que relacionó una desialilación global de las proteínas plasmáticas con un estado protrombótico, principalmente tras un evento en territorio arterial, fue el recientemente publicado por nuestro grupo y detallado en el capítulo I (Revilla *et al*, 2017). Posteriormente, ha sido descrito que la disminución de los niveles de NEU1 atenúa la aterosclerosis en un modelo murino (ratones knockout ApoE) a través de efectos directos sobre el metabolismo lipídico y los procesos inflamatorios, reduciendo el colesterol no HDL e inhibiendo la trans migración de

leucocitos, respectivamente (White *et al*, 2018). Finalmente destacamos el reciente trabajo que demuestra que la eliminación del ácido siálico de la superficie de las plaquetas inducida por la neuraminidasa soluble del *S. pneumoniae* (NanA) conduce a una hiperreactividad de estas y a su mayor interacción con los leucocitos (Kullaya *et al*, 2018).

Todavía menos información existe acerca de la modulación por ácido siálico de otros elementos con potencial efecto hemostático como complemento, hematíes o endotelio. En este contexto, un reciente estudio muestra nuevas evidencias sobre el papel crítico de los ácidos siálicos en la regulación del complemento, especialmente en la hemólisis mediada por el factor H, que además tiene implicaciones en la fisiopatología del síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), una rara microangiopatía trombótica (Hyvärinen *et al*, 2016).

El objetivo de este estudio es valorar los efectos de la eliminación enzimática del ácido siálico de manera global y también individual en proteínas clave de la coagulación mediante un modelo de desialilación *in vitro*. Específicamente estudiaremos proteínas claves en hemostasia, como la antitrombina (el anticoagulante endógeno más potente) y en aquellas en las que un defecto del contenido del ácido siálico pudiera tener más peso funcional, como el FXII, ya que se activa por unión a superficies cargadas negativamente y existe una variante patológica T309K que provoca angioedema hereditario por eliminación de un O-glicano que se posiciona en la Thr309. Pero también queremos analizar si el contenido de azúcar influye sobre procesos hemostáticos complejos como los tiempos de coagulación, el estado de activación plaquetaria, o la susceptibilidad a la hemólisis mediada por complemento.

2. Material y Métodos

2.1. Modelo de desialilación *in vitro*

Se empleó una neuraminidasa de amplio espectro: neuraminidasa α 2-3,6,8 de *C. perfringens* (Sigma-Aldrich, Madrid, España). La mayoría de experimentos se realizaron en voluntarios sanos, aunque ciertos estudios se realizaron con pacientes. La sangre se extrajo de mediante venopunción y se anticoaguló con citrato. El plasma rico en plaquetas, el plasma pobre en plaquetas o la sangre total se incubaron toda la noche (ON) a 37°C con 5 U/ml de neuraminidasa. Las plaquetas lavadas, por su mayor labilidad, sólo se incubaron durante 60 min a 37°C. En todos los casos, junto a la muestra tratada con neuraminidasa, se incubó de forma paralela la misma muestra sin tratamiento enzimático (en la que la neuraminidasa se sustituía por suero salino fisiológico 0,9%).

El efecto del tratamiento con neuraminidasa en las proteínas plasmáticas se verificó mediante identificación de formas hiposialiladas tras separación electroforética en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posterior inmunodetección mediante Western Blot empleando anticuerpos específicos (Tabla 1), básicamente siguiendo procedimientos previamente descritos (Corral *et al*, 2004). La desialilación en plaquetas se evaluó cuantificando mediante citometría de flujo la unión de la lectina RCA-1 marcada con fluoresceína (Vector Labs, Burlingame, CA) (5 μ g / ml, 60 min, 37°C) tal y como se ha descrito previamente (Revilla *et al*, 2018). RCA-1 se une a los residuos β 1-4-galactosa de las proteínas que quedan expuestos tras la eliminación del ácido siálico por el tratamiento con neuraminidasa.

2.2. Actividad funcional de proteínas plasmáticas: métodos cromogénicos y Western blot

La actividad funcional de la **antitrombina** (evaluada frente a dos proteasas diana de este anticoagulante: FXa y FIIa) se determinó por métodos cromogénicos empleando plasma citratado (Corral *et al*, 2007). Las formas de alta y baja afinidad por heparina de la antitrombina se separaron por inmunoelectroforesis cruzada (CIE) siguiendo un protocolo previamente descrito por nuestro grupo (Corral *et al*, 2003). El estudio del efecto de la desialilación en antitrombina se realizó en muestras de sujetos sanos y de pacientes con deficiencia de antitrombina con distintas mutaciones que provocan una deficiencia tipo II HBS, un tipo de deficiencia en el que la proteína variante, se pliega y secreta correctamente, pero no se une de manera adecuada a la heparina o su unión no provoca la activación de la serpina (Corral *et al*, 2018).

Los niveles y activación del **FXII** en plasma se evaluaron mediante electroforesis y Western Blot, como se ha descrito previamente. La identificación del FXII y del FXII activado (FXIIa) plasmático se realizó empleando un anticuerpo policlonal de cabra anti-FXII humano (Tabla 1). El FXII plasmático silvestre presenta una masa molecular de 80 KDa en geles de SDS en condiciones reducidas, mientras que la cadena pesada resultante de su activación, que es la única que reconoce el anticuerpo empleado en este estudio, tiene una masa de 50 KDa, permitiendo así la discriminación mediante Western Blot. La activación de FXII se realizó con sílica micronizada (SynthAsil, Instrumentation Laboratory Co, Bedford, MA, USA) empleando tanto la solución stock como diluciones 1/10, 1/20 y 1/50. La activación se realizó durante 10 minutos a 37°C. Así mismo, como activador de la fase fluida del FXII empleamos dextrán sulfato (DXS) a diferentes

concentraciones: desde 0,001 $\mu\text{g/mL}$ a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos a 37°C. Además, la activación del FXII con DXS (utilizando dos concentraciones diferentes: 100 ng/mL y 100 $\mu\text{g/mL}$) también se evaluó empleando un sistema amidolítico utilizando un sustrato cromogénico específico para el FXII (S-2302, Chromogenix, Werfen, Barcelona, España). La cuantificación de la paranitroanilina liberada se realizó evaluando la absorbancia a 405nm. La activación tanto del **FXI** como de **calicreína** secundaria a activación del FXII (ambas dianas proteolíticas del FXIIa) se valoró mediante electroforesis y Western blot (Tabla 1). El estudio de la calicreína se realizó con un anticuerpo policlonal anti-calicreína humana amablemente cedido por el Dr. J. Emsley (Universidad de Nottingham, Reino Unido). Este anticuerpo detecta la calicreína intacta (86 KDa), la activada proteolíticamente (36 KDa) y la que forma parte del complejo calicreína activada:C1-INH (195 KDa).

Tabla 1. Anticuerpos y condiciones electroforéticas empleadas para la detección inmunológica de diferentes elementos hemostáticos mediante Western blot.

Proteína	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	Condiciones electroforesis
	Referencia	Tipo		
Antitrombina	A9522 (Sigma)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	Nativo (+/- 6M urea); SDS (CR y CNR)
Antitrombina	NAS AT III (Siemens)	Policlonal de conejo	NA9340V (Amersham)	CIE
FXI	GA-FXI-AP (Enzyme Research Laboratories)	Policlonal de cabra	A-9452 (Sigma)	SDS (CNR)
FXII	GA-FXII-AP (Enzyme Research Laboratories)	Policlonal de cabra	A-9452 (Sigma)	SDS (CR)
Calicreína	Proporcionado por Dr. J. Emsley (Universidad de Nottingham, Reino Unido).	Policlonal de cabra	A-9452 (Sigma)	SDS (CR)

Abreviaturas: SDS, en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio; CR, condiciones reductoras; CNR, condiciones no reductoras. CIE: Inmunoelectroforesis cruzada.

2.3. Estudios globales del sistema hemostático: tiempos de la coagulación y generación/degradación del coágulo de fibrina

El **tiempo parcial de tromboplastina activado** (TTPa) se determinó en un coagulómetro automatizado (ACL TOP 700, Instrumentation Laboratory Co), en el Hospital Universitario Morales Meseguer empleando sílica micronizada (SynthASil; Instrumentation Laboratory Co) como activador. Para el **tiempo de protrombina** (TP) se empleó un reactivo basado en factor tisular recombinante (HemosIL; Instrumentation Laboratory Co).

La **generación y degradación del coágulo de fibrina** se evaluó registrando en tiempo real la densidad óptica a 405 nm en un lector de placas (Synergy II) durante 4 horas a 37°C tras activar el plasma con factor tisular (0,01 mM) y cloruro cálcico (28,5 mM) en presencia y ausencia de activador del plasminógeno recombinante (rTPA) a 0,21 µg/ml.

2.4. Estudios funcionales plaquetarios: agregación plaquetaria y citometría de flujo.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo tras centrifugación de sangre total citratada a 150xg durante 10 min. El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo tras centrifugación de sangre total citratada a 700xg durante 15 min.

La agregación plaquetaria se evaluó por transmisión de luz (LTA, por sus siglas en inglés) empleando protocolos ya descritos por nuestro grupo que usan PRP diluido con PPP autólogo para conseguir una concentración aproximada de 300×10^9 /L plaquetas (Tello-Montoliu *et al*, 2012). Tras activación iniciada por la adición de un agonista plaquetario, se recoge en tiempo real la transmisión de luz durante 5 minutos empleando un agregómetro Aggrecoorder II (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia). Los agonistas utilizados para LTA fueron: colágeno (0,75 µg/mL y 10 µg/mL); CRP-XL (1 µg/mL y 10 µg/mL); ADP (2 µM y 10 µM); ácido araquidónico (AA) (1 mM, y 1,6 mM); ristocetina (0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL, y 1,25 mg/mL) y péptido activador del receptor de la trombina (PAR-1) (10 µM y 25 µM).

Para el estudio de activación plaquetaria con agonistas y valoración de la secreción de gránulos plaquetarios se empleó una técnica directa de citometría de

flujo en PRP diluido con PPP autólogo para conseguir una concentración de $20 \times 10^9/L$ plaquetas siguiendo protocolos previamente descritos por nuestro grupo (Hardy *et al*, 2018). Los anticuerpos monoclonales utilizados, todos de Becton Dickinson (San Jose, CA) fueron: APC*CD41a y PE*CD62 (P-selectina). La unión a fibrinógeno se valoró con FITC*Fg488. El PRP se empleó para valorar la capacidad de las plaquetas para activarse, secretar el contenido de sus gránulos alfa (CD62) y de realizar el cambio conformacional de la GPIIb/IIIa que permite la unión de fibrinógeno sin agonista (PBS) y tras estimulación con CRP-XL a dosis de $1 \mu g/mL$ y $10 \mu g/mL$; PAR-1 a dosis de $10 \mu M$ y $25 \mu M$; ADP a dosis de $2 \mu M$ y $10 \mu M$. Las muestras se analizaron en un citómetro BD Accuri C6 (Ann Arbor, MI, USA). Para cada muestra, se adquirieron 10000 eventos CD41a positivos y se analizó la intensidad de fluorescencia (IF), expresándose como mediana (BD CSampler Software). Cada muestra fue comparada (porcentaje de IF mediana) con su control sin neuraminidasa y sin agonista (PBS). Para poder llevar a cabo la comparación entre muestras estudiadas en diferentes días, en cada estudio siempre se incluía muestras del mismo sujeto (control interno). El control de la desialilación plaquetaria en los modelos de PRP citratado se realizó mediante la unión a RCA-1 por citometría de flujo como se indicó anteriormente.

Los estudios del tamaño plaquetario y de los niveles inmunorreactivos de determinadas proteínas de superficie plaquetaria se llevaron a cabo en plaquetas lavadas ($\approx 30 \times 10^9/L$) incubadas con sueros autólogos (2:1 v / v) durante 60 min a $37^\circ C$. Brevemente, las plaquetas se obtuvieron tras lavado de PRP en EDTA y fueron resuspendidas en un buffer comercial (Annexin-V Binding Buffer; eBioscience, San Diego, CA, USA). Para estos estudios se emplearon anticuerpos monoclonales marcados (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA): GPIIb

(CD42b), integrina αII_b (CD41a) y GPIX (CD42a), a través de una técnica directa estándar de citometría de flujo (Sánchez-Guiu *et al*, 2014). Para el análisis de P-selectina expresada en superficie (marcador de liberación de gránulos alfa) y granulofisina (marcador de gránulo denso y liberación lisosómica) se usaron anticuerpos anti-CD62-PE y anti-CD63-PE, respectivamente (Becton Dickinson). Los resultados se muestran como ratio entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la muestra desialilada (plaquetas lavadas y suero con neuraminidasa) frente a la misma muestra del mismo control sin neuraminidasa. En cada test, se adquirieron 10000 eventos de plaquetas y se analizaron en un FACSCalibur (BD Biosciences).

2.5. Test de sensibilidad a la hemólisis

Esta prueba se realizó con sangre total. Analizamos tanto la hemólisis generada durante una hora a temperatura ambiente (RT) espontánea (suero salino fisiológico 0,9%) como inducida por H_2O_2 4 mM (1:4 v/v) o Cl_2Ca 100 mM (Buffer Tyrode) (1:10 v/v). Para ello, cuantificamos los niveles de hemoglobina (Hb) libre, para lo que tras esta incubación, las muestras se centrifugaron 700xg durante 5 minutos. La concentración de Hb libre en estas muestras se midió mediante fotometría empleando el sistema Hemocue (HemoCue® Hb 301 System, HemoCue AB, Suecia). También se registraron los valores de Hb total y el hematocrito de cada muestra de sangre total antes de su tratamiento en el analizador automatizado XS-1000i de Sysmex. El porcentaje de hemólisis se calculó midiendo el contenido de Hb total, el hematocrito y el contenido de Hb del sobrenadante de cada muestra tras la incubación y posterior centrifugación utilizando la siguiente fórmula previamente descrita (Makroo *et al*, 2011):

$$\text{Hemólisis} = \frac{\text{Hb plasma} \times (1 - \text{Hto}) \times 100}{\text{Hb sangre total}}$$

Hb= hemoglobina; Hto= hematocrito.

2.6. Estudio molecular del extremo C-terminal del gen del factor H (CFH)

Las mutaciones en el extremo C-terminal del *CFH*, el gen que codifica el factor H, se determinaron secuenciando mediante PCR los exones 21 y 22 y sus regiones flanqueantes (tránsito ENST00000367429.8) ya que estos exones codifican los dominios funcionales 19 y 20 del factor H, la zona de unión a las superficies celulares (C3b, endotelio, hematíes, etc). Los primers empleados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Primers empleados para la amplificación por PCR y posterior secuenciación de los exones 21 y 22 del gen *CFH*.

Exon	Primer forward	Primer Reverso
Exon 21	5'ACAGTGCTGTGTTTTCGTTT3'	5'GCAGATCACGAGGTCAGGAG3'
Exon 22	5'TCGAACCTCATTTTCACATCGA3'	5'TATAAGCTGAGACCGGTGGC3"

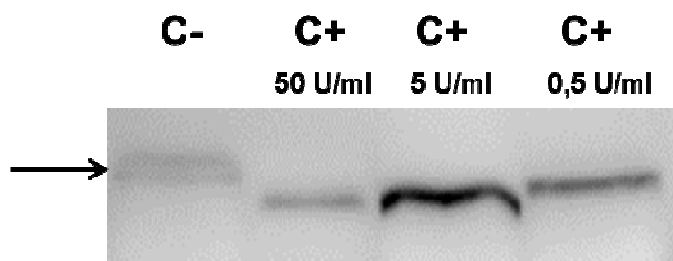
El producto de PCR, tras confirmar la especificidad de amplificación en un gel de agarosa con el colorante gel red bajo luz ultravioleta se purificó y secuenció empleando los sistemas indicados anteriormente (capítulo I).

3. Resultados

3.1. Verificación de la desialilación en las diferentes muestras

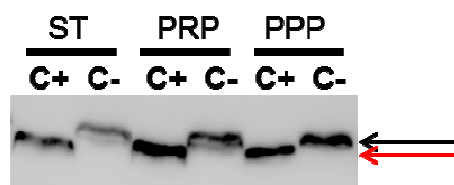
La pérdida del ácido siálico terminal incrementa la movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes como consecuencia de una disminución del tamaño de la proteína y de su carga negativa, lo que puede ser detectado mediante Western blot. La proteína más sensible a diferencias electroforéticas dependientes del contenido de ácido siálico fue, en nuestras manos, el FXII, que contiene 2 sitios de N-glicosilación y un número indeterminado de O-glicanos (Figura 1).

Figura 1. Movilidad electroforética del FXII dependiente del grado de desialilación generado por diferentes dosis de neuraminidasa (C+) (0,5-5-50 U/ml) en muestras de PPP. La flecha señala la movilidad electroforética del FXII en ausencia de tratamiento enzimático (C-).



Con 5 U/ml de neuraminidasa se consigue una desialilación completa en el FXII plasmático detectada mediante Western Blot independientemente del tipo de la muestra: PRP (n= 8), PPP (n= 10) o sangre total (n=4) (Figura 2).

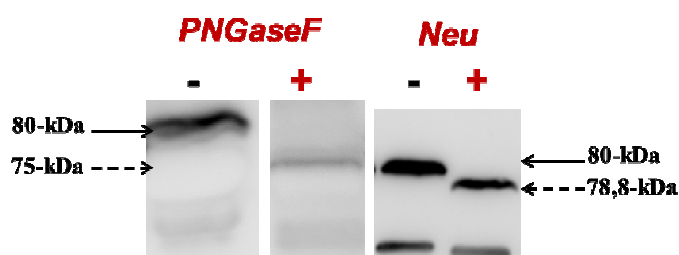
Figura 2. Movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes y reductoras del FXII de distintas muestras de un sujeto sano: Sangre total (ST); plasma rico en plaquetas (PRP); o plasma pobre en plaquetas (PPP) detectado mediante Western blot. Las muestras se trataron (+) o no (-) con 5 U/mL de neuraminidasa. La flecha negra marca la proteína íntegra y la roja la proteína desialilada



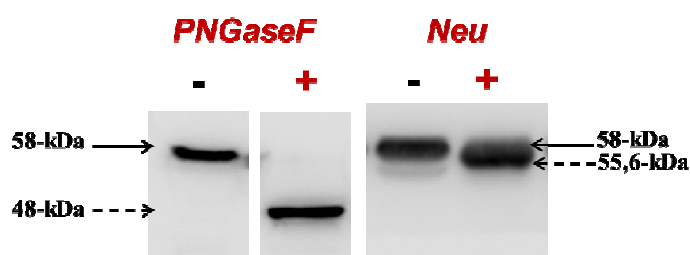
También comparamos las consecuencias electorforéticas de la eliminación completa de N-glicanos (N-glicosidasa F) y de siálicos (Neuraminidasa) en dos proteínas hemostáticas: FXII y antitrombina (Figura 3).

Figura 3. Movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes y reductoras del FXII (A) y de la antitrombina –AT- (B) tras tratamiento enzimático con N-glicosidasa F (*PNGaseF*) o con neuraminidasa (*Neu*). Las flechas continuas muestran el FXII y antitrombina con glicanos íntegros, mientras que las discontinuas muestran las formas deglicosiladas o desialiladas.

A) FXII

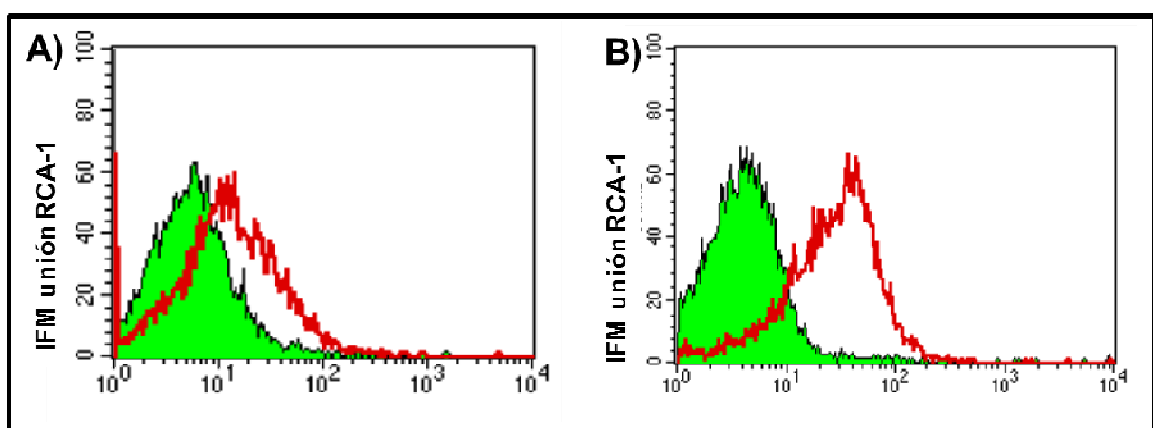


B) AT



La desialilación en las proteínas de la superficie plaquetaria fue verificada mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como mediana de intensidad de fluorescencia media (IMF) y rango intercuartílico (RIQ) respecto a la misma plaqueta control sin neuraminidasa normalizada a un 100%. Las muestras tratadas con neuraminidasa presentaban un aumento variable en la IMF en la unión a la lectina RCA-1, en todos los casos >150%. La mayor IMF se observó en plaquetas lavadas resuspendidas en suero autólogo (339,57%, RIQ 212,30%-609,49%; n=38 p<0,001) respecto a las muestras de PRP (250,90%, RIQ 233,69-273,96; n=3 p=0,109) (Figura 4).

Figura 4. Análisis del nivel de desialilación en plaquetas evaluando la unión a la lectina RCA-1. Se representan los valores de intensidad de fluorescencia media (IMF) de las plaquetas incubadas con neuraminidasa (línea roja) respecto a la misma plaqueta control sin neuraminidasa (en verde). En A se muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en PRP y en B un ejemplo representativo de la unión de la lectina a plaquetas lavadas del mismo sujeto.

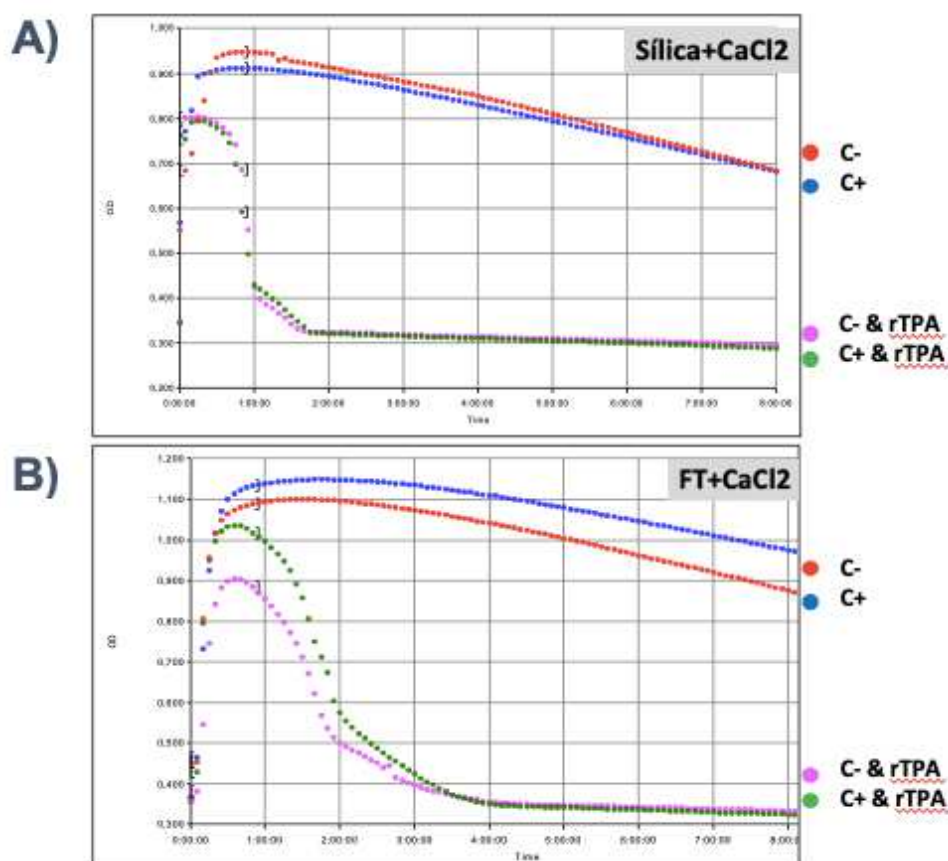


3.2. *La eliminación enzimática del ácido siálico no tiene efecto en los estudios globales del sistema hemostático*

En cuanto a las pruebas de hemostasia global, la desialilación prolongó el TP: 82,5% (RIQ 71,3-84,0) vs 77,5% (RIQ 67,5-81,5), aunque las diferencias no alcanzaron significado estadístico ($p= 0,068$, $n= 4$). El bajo número de muestras analizado y el resultado del TP en el límite inferior de la normalidad en la muestra sin neuraminidasa aconseja ampliar el número de muestras para concluir que el tratamiento con neuraminidasa no afecte al TP. Sin embargo, los resultados en el TTPa (ratio) fueron más homogéneos e indican que la desialilación no afecta significativamente a este tiempo de coagulación: 1,12 (RIQ 1,06-1,22) en plasma desialilado vs 1,13 (RIQ 1,07-1,22) en plasma control ($p= 0,655$, $n= 4$).

La formación y degradación del coágulo fue también similar en el plasma desialilado y no desialilado ($n=3$) en todas las condiciones evaluadas (Figura 5).

Figura 5. Formación y degradación del coágulo. Se muestra un ejemplo representativo de la formación y degradación del coágulo evaluado por fotometría (OD 405nm) de un sujeto sano tras activación del PPP con sílica y cloruro cálcico (A) o con factor tisular (FT) y cloruro cálcico (B); en presencia o en ausencia de activador del plasminógeno tisular (rTPA). El experimento se realizó tanto en el plasma no desialilado (C-) como en el plasma tratado con neuraminidasa (C+).



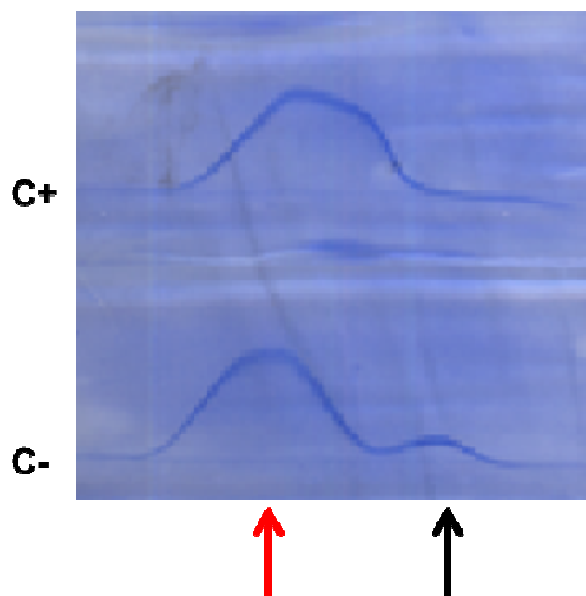
3.3. Efecto de la desialilación completa in vitro en proteínas plasmáticas de la coagulación

El análisis del efecto de la pérdida de ácido siálico en la antitrombina plasmática refleja que esta mantiene íntegramente su actividad anti-Xa y anti-FIIa. La mediana de actividad anti-Xa en plasma desialilado fue del 99,86% (RIQ 97,40-101,51) vs 98,80% (RIQ 94,69-100,90) en plasma control ($p=0,241$, $n=10$).

La mediana de actividad anti-FIIa en plasma desialilado fue del 86,76% (RIQ 84,88-110,05) vs 91,96% (72,22-113,99) en plasma control ($p= 0,799$, $n= 10$).

El efecto de la desialilación en la afinidad por heparina de la antitrombina se analizó mediante inmunoelectroforesis cruzada (CIE). Como se observa en la figura 6, la desialilación modificaba significativamente el patrón de formas de antitrombina en función de su afinidad por heparina. La forma con baja afinidad por heparina, que representa un 5% del total de la antitrombina plasmática en un sujeto sano, desaparecía en la muestra del mismo sujeto tratada con sialidasa.

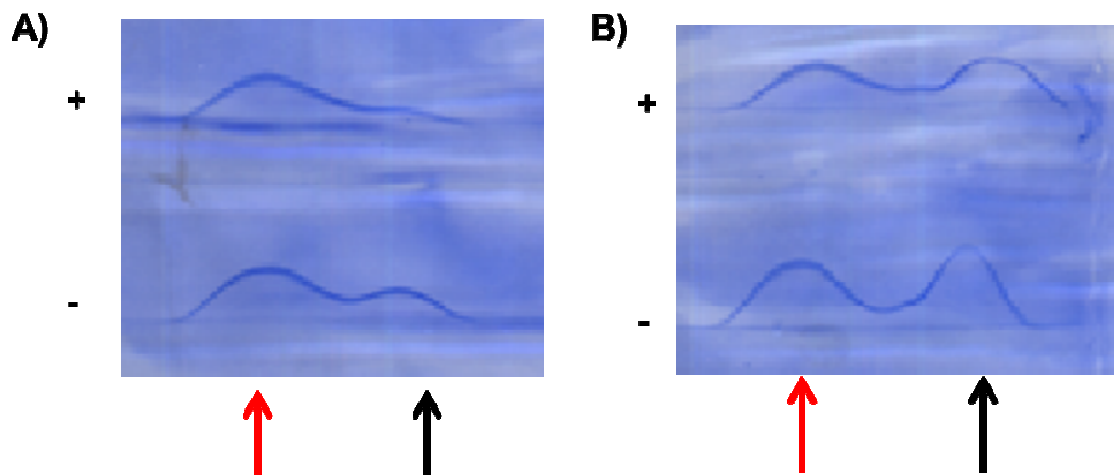
Figura 6. Cambios en el patrón de separación electroforética en inmunoelectroforesis cruzada en presencia de heparina de la antitrombina plasmática de un sujeto sano con (C+) o sin (C-) tratamiento con neuraminidasa. La forma con baja afinidad por heparina se marca con una flecha negra mientras que la de alta afinidad con una flecha roja.



Estos resultados sugieren que la desialilación podría aumentar la afinidad por heparina en las formas con baja afinidad por heparina. Para confirmar este

efecto y además buscar una potencial aplicación, tratamos con neuraminidasa el plasma de dos pacientes con deficiencia de antitrombina heterocigota tipo II HBS causadas por dos mutaciones diferentes: 1) L131F (Antitrombina Budapest III) afecta a la afinidad por heparina de forma indirecta (Olds *et al*, 1992); 2) R79C (Antitrombina Toyama) afecta a un residuo que directamente interacciona con la heparina (Koide *et al*, 1984). Como está descrito (Olds *et al*, 1992; Koide *et al*, 1984), las muestras sin tratar presentaban dos formas de similar intensidad, una de baja y otra de alta afinidad por heparina. Sin embargo, los niveles de la forma con baja afinidad por heparina se redujeron considerablemente en la muestra tratada con neuraminidasa exclusivamente en la muestra portadora de la antitrombina Budapest III (Figura 7).

Figura 7. Cambios en el patrón de separación electroforética en inmunoelectroforesis cruzada en presencia de heparina de la antitrombina plasmática de dos pacientes con mutaciones heterocigotas responsables de dos deficiencias tipo II HBS en muestra basal (-) y tratada con neuraminidasa (+). A) L131F (Antitrombina Budapest III). B) R79C (Antitrombina Toyama). La forma con baja afinidad por heparina se marca con una flecha negra mientras que la de alta afinidad con una flecha roja.



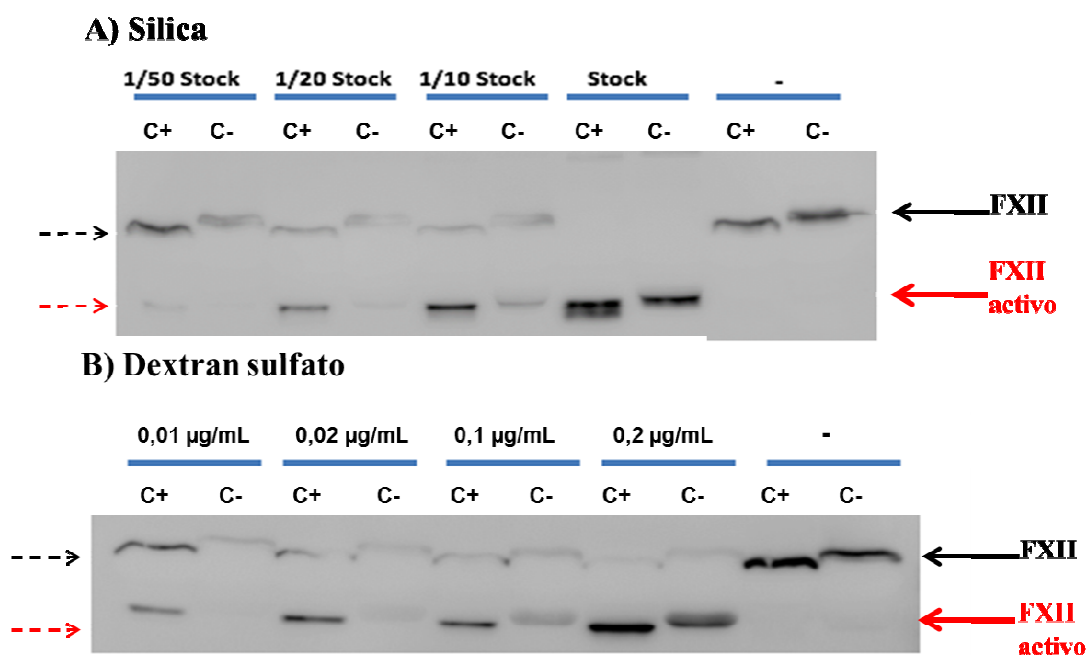
Las consecuencias funcionales de este cambio se evaluaron en un ensayo funcional con sustratos cromogénicos. Como indica la tabla 3, la muestra del paciente con la variante Budapest tratada con neuraminidasa recupera el 19% de la actividad anticoagulante respecto a la muestra no tratada, mientras que la de la variante Toyama no recupera ninguna actividad, y el control solo experimenta un ligero aumento de la actividad anticoagulante.

Tabla 3. Efecto del tratamiento con neuraminidasa en la actividad anticoagulante del plasma (anti-FXa) de un sujeto sano, y dos pacientes con mutaciones heterocigotas en *SERPINC1*, responsables de deficiencias tipo II HBS, una que afecta a un residuo directamente implicado en la interacción con la heparina (antitrombina Toyama; R79C) y otro con una mutación que realiza su efecto patogénico de forma indirecta (antitrombina Budapest III; L131F). Los valores representan la actividad porcentual respecto al valor observado en un plasma de referencia generado con 100 donantes de sangre sanos.

Mutación	Sin Neuraminidasa	Con Neuraminidasa	Incremento actividad
Sin mutación	84,21	85,21	+1,01%
L131F	46,99	66,10	+19,11%
R79C	41,20	38,94	-2,26%

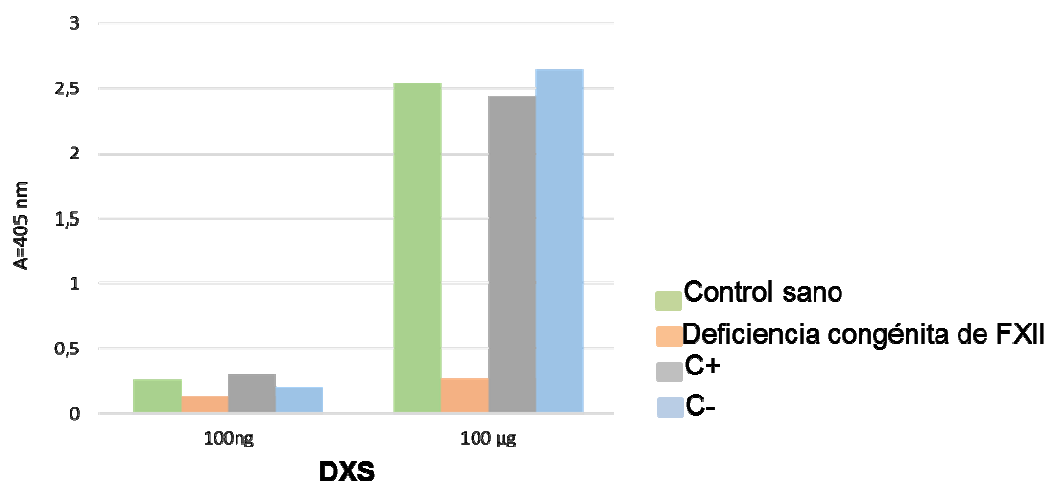
Los resultados observados para el FXII fueron conflictivos. El estudio mediante Western blot del FXII plasmático con diferentes activadores podría inducir a pensar que el FXII desialilado podría activarse más potentemente que el FXII no desialilado por la mayor señal de forma activada que se observa, especialmente cuando se emplean dosis bajas de sílica o DXS (Figura 8).

Figura 8. Activación del FXII plasmático normal (-) o desialilado (+) inducido por sílica (A) o dextran sulfato (B). Las muestras se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE empleando condiciones reducidas y el FXII se detectó mediante Western blot. Las flechas negras indican el zimógeno FXII mientras que las rojas marcan la cadena pesada del FXII activo. Las moléculas completamente desialiladas se marcan con flechas discontinuas mientras que las completamente sialiladas se marcan con flechas enteras.



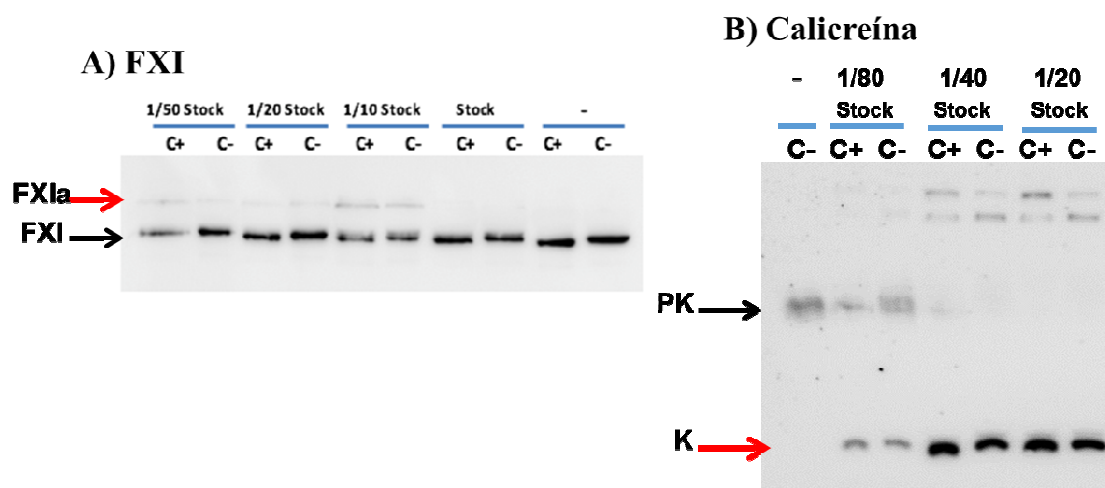
Sin embargo, los resultados funcionales que evaluaron la actividad del FXIIa por métodos cromogénicos sugieren que no existen diferencias entre el FXII desialilado y el no desialilado (Figura 9).

Figura 9. Valoración de la activación del FXII mediante un sistema cromogénico. La activación del FXII plasmático se evaluó empleando un sustrato cromogénico específico (S-2302) tras activar al plasma desialilado (C+) o sin desialilar (C-) de un control con dos dosis de dextran sulfato (DXS) altas (100 µg/mL) y bajas (100 ng/mL). Como control negativo se utilizó plasma basal de un paciente con deficiencia congénita de FXII (<3%) y de un sujeto sano.



Además, tampoco se observaron diferencias en la activación de los sustratos del FXII activado: ni FXI ni calicreína (Figura 10).

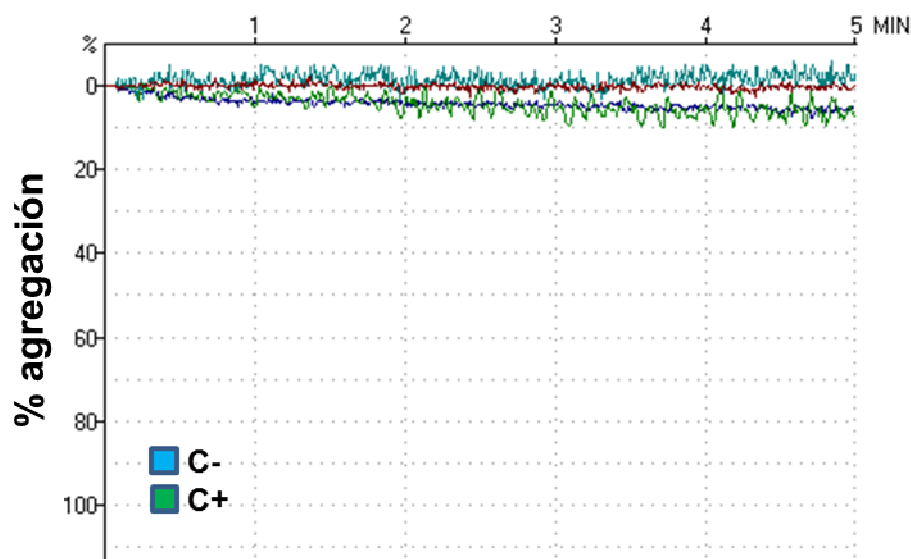
Figura 10. Valoración de la activación del FXI (A) y Calicreína (B) mediante Western Blot tras activación del FXII con sílica en plasma tratado (C+) y sin tratar (C-) con neuraminidasa. La forma nativa de FXI y la precalicreína se muestran con flechas negras, mientras que el FXI activo y la calicreína se marca con una flecha roja. PK: precalicreína, K: calicreína.



3.4. Reactividad plaquetaria en muestras no activadas

La desialilación de plaquetas *in vitro* no provocó agregación espontánea. La mediana y rango intercuartílico (RIQ) de agregación espontánea en control sin sialidasa y en las plaquetas tratadas con neuraminidasa fue de 8,5% (RIQ 6,50% – 9,75%) vs 7,0% (RIQ 3,50% – 10,12%), respectivamente ($p=0,461$; $n=4$) (Figura 11).

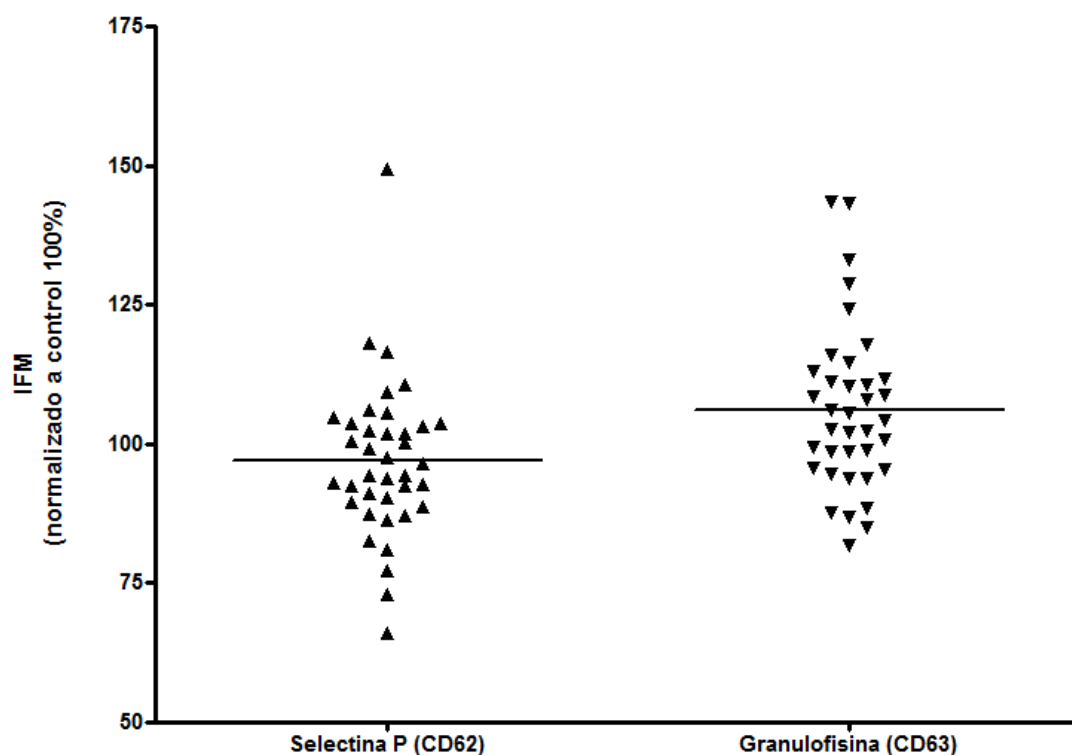
Figura 11. Agregación plaquetaria espontánea en PRP tratado con neuraminidasa (C+) y no tratado (C-) de un sujeto sano.



Se llevaron estudios adicionales con mezclas de PPP desialilado con plaquetas sin tratar, y de PPP sin tratar con plaquetas desialiladas, pero en ninguna de estas combinaciones se observaron agregaciones plaquetarias espontáneas (los datos no se muestran).

Las plaquetas lavadas de controles incubadas con suero autólogo y tratadas con neuraminidasa *in vitro* mostraron un aumento discreto, pero significativo frente a las no tratadas, de la expresión basal de CD63 (Mediana 104,32%; RIQ 95,42%-112,29%, $p=0,039$; $n=37$), sin que la expresión de CD62 basal mostrara cambios significativos (95,44%; RIQ 89,26% – 103,77%, $p=0,057$; $n=38$) (Figura 12).

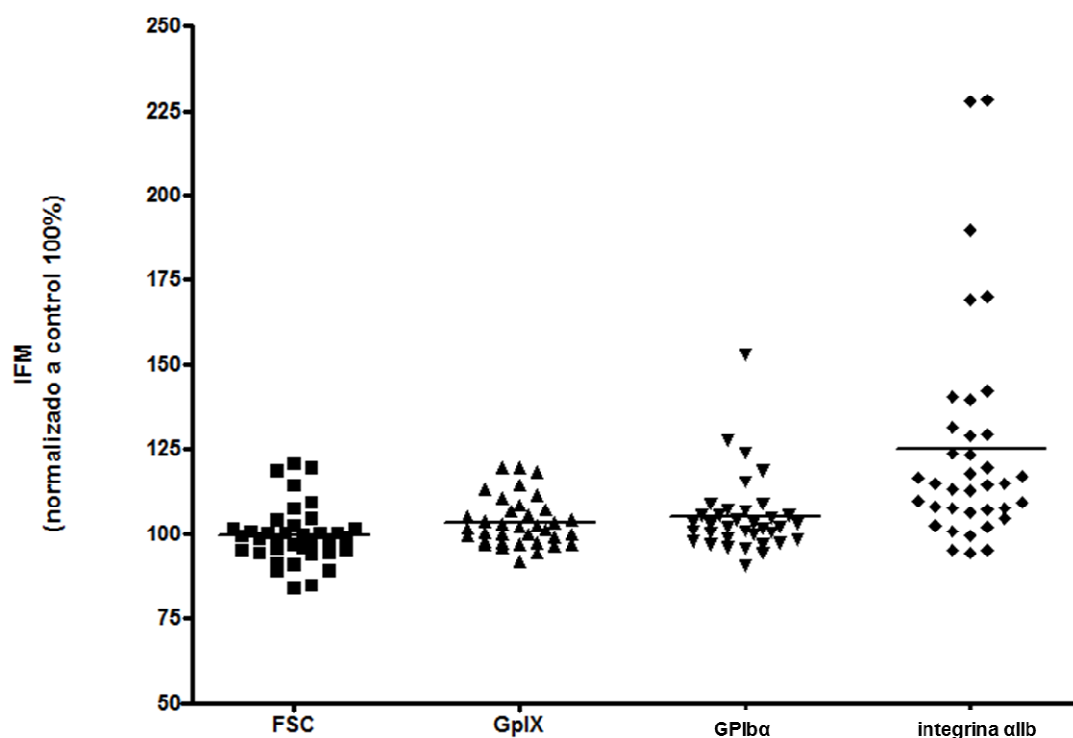
Figura 12. Expresión basal de CD63 (granulofisina) y CD62 (Selectina P) en plaquetas desialiladas. Los valores se expresan como intensidad media de fluorescencia (IFM) normalizada con la observada en la misma muestra sin tratar con neuraminidasa (100%). La línea horizontal representa la media.



El tamaño de la plaqueta desialilada, evaluado mediante citometría de flujo con el parámetro FSC, no fue estadísticamente diferente del de la plaqueta no desialilada (98,87%, RIQ 94,75% - 101,96%; $p = 0,338$; $n = 37$) (Figura 13). Sin embargo, sí observamos diferencias significativas en la expresión en superficie de las principales glicoproteínas plaquetarias. Así, las plaquetas tratadas con neuraminidasa presentaban una expresión estadísticamente superior aunque de forma discreta para la GPIb α (102,33%, RIQ 98,37% - 106,43%; $p = 0,009$; $n = 36$) y la GPIX (102,02%, RIQ 97,60% - 106,91%; $p = 0,023$; $n = 36$); y notablemente

superior para la integrina α IIb (114,99%, RIQ 106,73% - 130,50%; $p < 0,001$; $n = 37$) (Figura 13).

Figura 13. Tamaño (FSC) y expresión de las principales glicoproteínas de superficie plaquetaria en plaquetas desialiladas evaluadas por citometría de flujo. Los valores se expresan como intensidad de fluorescencia media (IFM) normalizada con la observada en la misma muestra sin tratar con neuraminidasa (100%). La línea horizontal representa la media.



3.5. Reactividad plaquetaria inducida por agonistas

Analizamos el efecto de la pérdida de ácido siálico en la reactividad plaquetaria mediante estudios de agregometría y de citometría de flujo tras estimulación con diferentes agonistas. En relación con la agregación plaquetaria, para la mayoría de agonistas esta fue similar en PRP tratado con neuraminidasa (C+) que en sus respectivos controles sin tratar (C-). Sin embargo, tras exposición

a dosis bajas de PAR-1 (10 μ M) las plaquetas desialiladas presentaban mayor agregación que las no desialiladas (Tabla 4).

Destacamos los resultados de la aglutinación inducida por ristocetina. A dosis bajas (0,8 mg/mL), la aglutinación fue significativamente mayor en PRP desialilado que en no desialilado (69,0%, RIQ 33,3%-86,5% vs 13,5%, RIQ 6,3%-27,3%; $p=0,043$; $n=5$) (Tabla 4, Figura 14A). A dosis más altas (1,0 y 1,25 mg/mL), aunque el valor final de aglutinación fue similar, las plaquetas desialiladas mostraron un perfil de agregación más rápido que el de las plaquetas no desialiladas (Figura 14B).

Figura 14. Perfil de aglutinación inducida por ristocetina en PRP desialilado (C+) y PRP no desialilado (C-) de un sujeto sano.

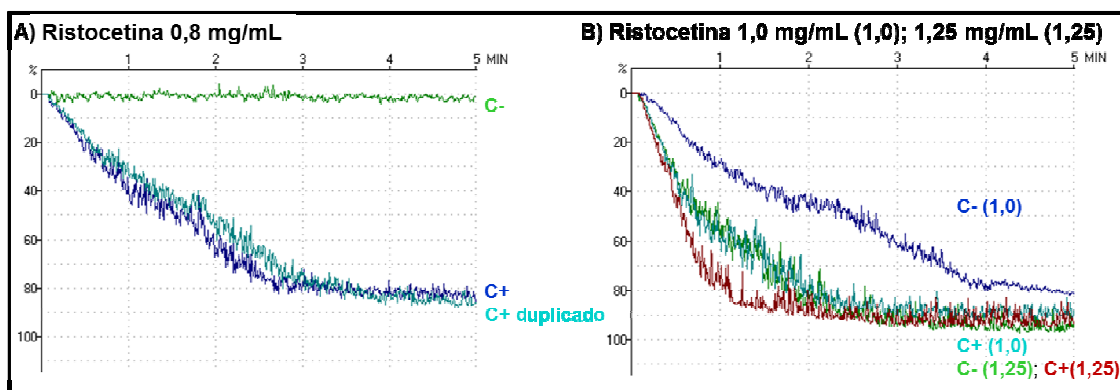


Tabla 4. Agregación plaquetaria del PRP tratado con neuraminidasa (C+) y sin tratar (C-) en respuesta a distintas dosis de diferentes agonistas plaquetarios. Se representa la mediana y el rango intercuartílico.

	ADP (μM)		Colágeno ($\mu\text{g/ml}$)		CRP-XL ($\mu\text{g/ml}$)		AA (mM)		PAR-1 (μM)		Ristocetina (mg/mL)		
	2	10	0,75	10	1	10	1	1,6	10	25	0,8	1,0	1,25
N	3	3	3	3	2	2	1	1	2	2	5	5	3
C+	46,5% (32,0-49,0)	83,5% (79,5-84,0)	2,0% (1,5-5,5)	99,5% (93,0-102,5)	39,5% (6,8-52,5)	88,3% (65,6-66,8)	88,5%	89,5%	31,8% (8,3-39,4)	65,0% (34,1-63,4)	69,0% (33,3-86,5)	93,5% (78,8-96,8)	93,0% (90,0-95,0)
C-	42,0% (34,0-56,5)	81,5% (78,5-82,0)	3,0% (1,5-4,5)	98,5% (96,0-98,8)	37,8% (4,1-52,5)	85,3% (61,1-66,8)	90,5%	88,0%	18,3% (3,8-23,6)	60,3% (30,0-60,4)	13,5% (6,3-27,3)	82,5% (70,8-87,3)	92,5% (73,0-93,5)
p	0,593	0,102	1,000	0,593	0,317	0,655	--	--	0,180	0,180	<u>0,043</u>	0,138	0,285

El estudio de la activación plaquetaria inducida por agonistas empleando citometría de flujo evaluó la unión de fibrinógeno y la liberación de CD62. Los resultados observados en muestras de 10 sujetos sanos, al igual que los obtenidos en agregación, reflejaban una mayor activación plaquetaria tras activación con diversos agonistas en las muestras tratadas con neuraminidasa (Tabla 5), fundamentalmente en el análisis de unión de fibrinógeno.

Tabla 5. Unión de fibrinógeno y expresión de Selectina P en plaquetas tras activación con agonistas en PRP desialilado (C+) y no desialilado (C-). Se muestran las medianas y el rango intercuartílico de la mediana de intensidad de fluorescencia de PRP con neuraminidasa (C+) respecto al mismo PRP control sin neuraminidasa (C-) normalizada a un control interno no activado (100%).

Agonista	P Selectina			Unión a fibrinógeno		
	C- (n=10)	C+ (n=10)	p	C- (n=10)	C+ (n=10)	p
CRP-XL 1 µg/mL	318,83 (125,26- 600,13)	424,87 (179,40- 623,18)	0,059	151,67 (124,42- 237,82)	200,83 (172,64- 312,94)	<u>0,013*</u>
CRP-XL 10 µg/mL	504,62 (219,80- 754,55)	562,08 (308,35- 671,99)	0,508	184,49 (170,08- 344,25)	240,29 (224,18- 369,05)	0,059
PAR-1 10 µM	143,49 (125,89- 166,60)	154,53 (135,91- 183,72)	0,169	103,47 (86,92- 116,37)	126,77 (112,19- 145,15)	<u>0,022*</u>
PAR-1 25 µM	212,97 (167,33- 364,35)	224,27 (166,43- 348,21)	0,646	116,78 (101,54- 137,07)	137,34 (123,03- 168,42)	<u>0,009**</u>
ADP 2 µM	173,71 (127,79- 227,48)	203,68 (168,45- 278,72)	<u>0,022*</u>	125,50 (101,99- 139,10)	160,24 (132,24- 182,09)	<u>0,007**</u>
ADP 10 µM	200,64 (147,15- 239,44)	227,05 (173,57- 323,27)	<u>0,013*</u>	130,40 (108,34- 159,36)	163,76 (135,57- 180,90)	<u>0,013*</u>

3.6. Efecto del ácido siálico en la hemólisis

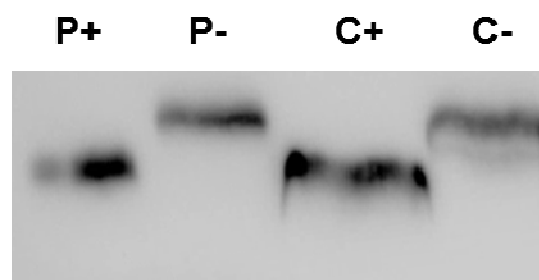
Tras los estudios en proteínas del plasma y en plaquetas, en este apartado pretendemos evaluar el impacto del ácido siálico en la sensibilidad del hematíe y su potencial papel en la hemólisis, especialmente la mediada por complemento. Por ello, en este apartado se trata con neuraminidasa la sangre completa. Una vez verificado que la desialilación es completa, evaluando el FXII plasmático (Figura 2), analizamos la sensibilidad a la hemólisis de los hematíes empleando tres condiciones diferentes: hemólisis espontánea; hemólisis inducida por agua oxigenada, y hemólisis inducida por activación de proteasas. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de hemólisis en ninguna de las tres condiciones analizadas asociadas con la desialilación (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de hemoglobina libre en muestras de sangre total tratada durante una noche con neuraminidasa (C+) o sin tratar (C-) y expuestas durante 1 hora a ningún agente (hemólisis espontánea), agua oxigenada (H₂O₂) o cloruro cálcico (CaCl₂). Los valores se muestran como mediana y rango intercuartílico.

Condiciones hemólisis	C- (n=5)	C+ (n=5)	p
Espontánea	0,16% (0,10-0,33)	0,16% (0,15-0,25)	0,715
H₂O₂ (1 mM)	0,24% (0,11-0,33)	0,20% (0,13-0,30)	0,715
CaCl₂ (10 mM)	0,11% (0,09-0,37)	0,13% (0,10-0,43)	0,109

Este apartado se completó con el estudio de la hemólisis en muestra de un paciente con microangiopatía trombótica tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (MAT) no compatible con púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) ni con síndrome hemolítico urémico (SHU) típico, sometido a tratamiento con recambio plasmático y eculizumab, un anticuerpo monoclonal capaz de unirse específicamente a la proteína C5 impidiendo su disociación y bloqueando la cascada de activación del complemento a este nivel. En este paciente se descartó una desialilación relevante por análisis del FXII plasmático (Figura 15), pero podría tener cierta desialilación atendiendo a los valores de la IFM de RCA-1 a sus plaquetas lavadas (160,96% en el paciente vs. 100% en un control sano paralelo sin tratar vs. 273,96% en el control tratado con neuraminidasa).

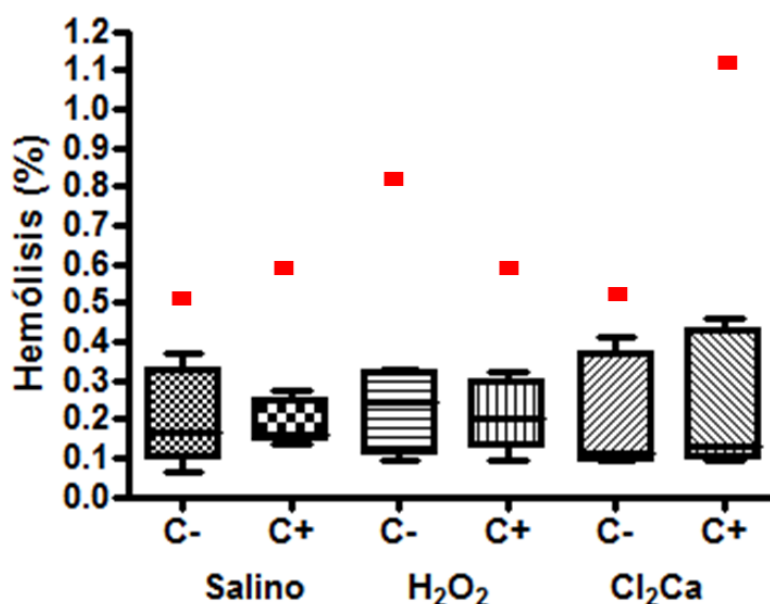
Figura 15. Desialilación en el paciente con síndrome hemolítico urémico atípico. FXII plasmático evaluado mediante Western Blot en el paciente con MAT con (P+) y sin neuraminidasa (P-) y en un control con (C+) y sin (C-) neuraminidasa.



El tratamiento con neuraminidasa y la posterior evaluación de la hemólisis en las tres condiciones indicadas de muestras de sangre total de 5 controles y del paciente durante el tratamiento con eculizumab mostró niveles mayores de

hemólisis que los controles sanos, pero sobre todo destacamos un mayor nivel de hemólisis mediada por complemento al activar la cascada de la coagulación con la adición de cloruro cálcico que la muestra sin desialilar (Figura 16).

Figura 16. Hemólisis en los controles sanos y en un paciente con SHUa. Se muestran las medianas y rangos de los resultados de hemólisis de controles (n=5) sin neuraminidasa (C-) y con neuraminidasa (C+) de forma espontánea (salino), tras adición de H_2O_2 1mM y tras adición de Cl_2Ca 10 mM. En cuadrado rojo se muestra el valor para cada experimento de un paciente con diagnóstico de SHUa en tratamiento con inhibidor del complemento C5 (Eculizumab).



La secuenciación de los exones 21 y 22 (dominios 19 y 20) del gen del FH (*CFH*) en el paciente y su hermano donante de progenitores hematopoyéticos, mostró la presencia de dos alteraciones c.3572C>T; p.Ser1191Leu / c.3590T>C; p.Val1197Ala en el dominio 20 del FH en los dos hermanos. Este estudio no

permite concluir si las dos alteraciones afectan al mismo alelo o si se encuentran en heterocigosis compuesta.

4. Discusión

Hasta la fecha, el estudio de factores implicados en los desórdenes trombóticos o hemorrágicos se ha centrado en analizar alteraciones en los niveles o la función de factores procoagulantes, anticoagulantes, proteínas plaquetarias y en los genes que codifican estas proteínas. Sin embargo, las MPT apenas se han analizado en este contexto aunque estamos asistiendo a la presentación de evidencias que soportan un peso destacado de estas alteraciones, que pueden modificar significativamente la masa y sobre todo el potencial electrostático de unas proteínas cuya función básica es precisamente interaccionar entre ellas. En este trabajo nos hemos centrado en el ácido siálico, el último residuo que se incorpora en el componente glucídico de la N- y O-glicosilación por tres motivos:

- a) La localización. Los residuos de ácidos siálico son los que mayor exposición presentan en cualquier glicoproteína. Por tanto son el primer elemento de contacto en interacciones proteína-proteína.
- b) La carga. Su carga neta negativa hacen que la presencia o ausencia de ácido siálico condicione decisivamente el potencial electrostático de las zonas expuestas de una proteína.
- c) La posibilidad de defectos en el contenido de ácido siálico tanto de base adquirida como congénita. De esta forma, la presencia de sialidasas exógenas, como las expresadas por muchos patógenos, pero también la deslocalización de sialidasas endógenas pueden reducir el contenido de ácidos siálicos de proteínas plasmáticas o plaquetarias. Por otra parte, mutaciones en genes implicados en la

generación del N- o el O-glicano provocan la pérdida de todo el glicano (incluido el siálico terminal) pero defectos en las sialiltransferasas pueden afectar exclusivamente al contenido de ácido siálico.

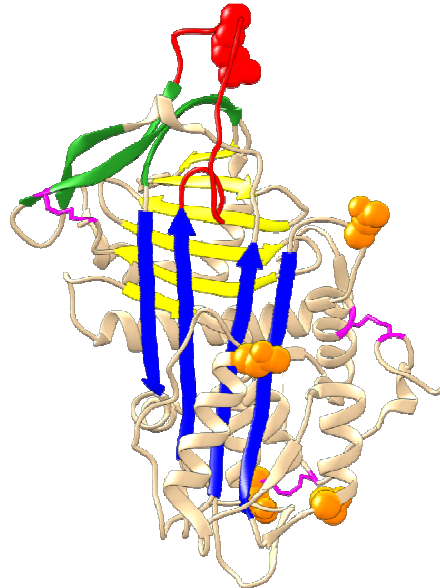
En este trabajo hemos desarrollado un modelo *in vitro* de desialilación completa con la idea de evaluar sus consecuencias en el sistema hemostático. La razón no es otra que el hallazgo previo que una desialilación completa en proteínas de la coagulación puede ocurrir en pacientes (Revilla *et al*, 2017). Adicionalmente, existen recientes evidencias que sugieren un papel cada día más importante para el ácido siálico de algunas proteínas o elementos del sistema hemostático. Este trabajo aporta nuevos datos sobre el papel del ácido siálico en diferentes elementos del sistema hemostático o su posible papel en el desarrollo de eventos trombóticos o hemorrágicos.

Los resultados obtenidos demuestran que la eliminación del ácido siálico mediante una neuraminidasa de amplio espectro induce hiperreactividad plaquetaria. Sin embargo, esta actividad enzimática no tiene un impacto mayor en las proteínas plasmáticas de la coagulación evaluadas en el estudio y no afecta a procesos globales de la coagulación, como se muestra en la normal formación y degradación del coágulo así como en los tiempos de coagulación.

El análisis del efecto de la pérdida de ácido siálico fue analizado en detalle en dos proteínas de la cascada de la coagulación, una procoagulante, el FXII y una anticoagulante, la antitrombina, por dos razones. La primera es que disponíamos de los recursos técnicos para poder estudiar estas proteínas en profundidad y en segundo lugar pero más importante, porque eran las candidatas a que un defecto en el contenido en ácido siálico tuviera mayor impacto funcional.

Así, la antitrombina, un anticoagulante endógeno crucial, cuya deficiencia incluso moderada incrementa notablemente el riesgo trombótico (Martinelli *et al*, 2014), contiene 4 residuos de N-glicosilación biantenarios (Hansson & Stenflo, 2005) por lo que contiene 8 residuos de ácido siálico. Además, esta serpina precisa de la interacción electrostática con un cofactor con carga neta negativa, la heparina, para conseguir una adecuada actividad anticoagulante (Huntington *et al*, 2000). La localización de los N-glicanos, alrededor del dominio de unión a heparina (Figura 17) justifica que la pérdida de alguno de estos residuos puede aumentar su afinidad por heparina, como ocurre con la antitrombina beta, una glicoforma que representa el 10% de la antitrombina plasmática y que es resultado de la ineficiente glicosilación de la Asn167 (Turk *et al*, 1997). Aunque serían necesarios estudios adicionales que evaluaran de forma detallada la afinidad por heparina de la antitrombina desialilada, nuestros resultados mostraron que la antitrombina plasmática desialilada mantiene íntegramente su actividad anti-Xa y anti-FIIa, validando así resultados descritos previamente (Peterson & Blackburn, 1985), que indican que el defecto de sialilación no tendría ningún efecto ni en la interacción con las proteasas diana, ni en el proceso de translocación de la misma tras el corte proteolítico del RCL en el mecanismo de inhibición.

Figura 17. Localización de los N-glicanos en la antitrombina. Las 4 asparaginas glicosiladas de la antitrombina se marcan en naranja. Las tres láminas beta se marcan en azul, amarillo y verde, mientras que el centro reactivo se marca en rojo, destacando el residuo P1 (Arg425).



Pero si la pérdida del potencial electrostático pudiera incrementar la afinidad por heparina, la desialilación podría revertir el efecto de ciertas mutaciones o alteraciones conformacionales asociadas con menor afinidad por heparina. De hecho, nuestro grupo ya demostró que la mutación responsable de la variante Budapest III (L131F) que reduce la afinidad por heparina de la forma alfa (Olds *et al*, 1992), no tiene efecto en la glicoforma beta (Martínez-Martínez *et al*, 2012). Mediante inmunolectroforesis cruzada confirmamos que la desialilación transforma una proporción muy significativa de la variante Budapest, con baja afinidad por heparina, a formas con alta afinidad por este cofactor, que además son funcionales. Estos resultados abren nuevas perspectivas futuras para el tratamiento de pacientes con estas mutaciones, especialmente los homocigotos, por su elevado

riesgo trombótico, y plantean nuevas posibilidades de aplicar esta modificación post-traducciona a proteína purificada si se necesitara aumentar su afinidad por heparina (siendo conscientes de que conllevaría una menor vida media y mayor tasa de aclaramiento). Este efecto no tiene lugar en las mutaciones que afectan residuos directamente implicados en la interacción con la heparina como la antitrombina Toyama (R79C).

Analizamos el impacto de la sialilación en el FXII por ser el primer factor de la ruta de contacto en desencadenar la activación de la coagulación y ser sensible a la activación por cargas negativas. Además, en el caso clínico que motivó el desarrollo de este modelo se verificó la desialilación de este factor de la coagulación (Revilla *et al*, 2017) y se conoce que la pérdida de un O-glicano completo como consecuencia de la mutación T309K en el FXII provoca una mayor autoactivación que causa angioedema hereditario (Björkqvist *et al*, 2015). Aunque los resultados de la activación del FXII mediante estudios inmunológicos (western-blot) podrían sugerir una mayor activación de la forma desialilada al compararla con la forma con ácido siálico, el estudio con métodos cromogénicos reveló una activación similar del FXII desialilado y no desialilado. Además, tampoco se observaron diferencias en la activación de las dos dianas proteolíticas del FXIIa: el FXI y la calicreína. Y como veremos posteriormente, tampoco la desialilación completa del FXII afecta de forma significativa al TTPa, un tiempo de coagulación dependiente de la activación del FXII con sílica. Todos estos resultados nos llevan a especular que la mayor intensidad en las bandas desialiladas del FXIIa podrían ser reflejo de un mejor reconocimiento de la forma desialilada por parte del anticuerpo empleado en el estudio. De hecho, las

interacciones proteína-proteína, como la que ocurre entre antígeno y anticuerpo, son altamente dependientes de potencial electrostático. Sin embargo, la desialilación del FXII no parece alterar su actividad hemostática *in vitro*.

Experimentos parecidos a los diseñados en este capítulo han mostrado que la desialilación de otros factores procoagulantes, como el FIX y FX, tampoco tiene efecto funcional importante (Bharadwaj *et al*, 1995).

En su conjunto, la desialilación no parece tener grandes efectos funcionales sobre las proteínas plasmáticas del sistema hemostático, pero se ha objetivado por primera vez un papel de la desialilación en variantes patológicas ciertamente sorprendente, al ser capaz de revertir parcialmente *in vitro* el efecto patogénico de una mutación y cuyas posibilidades y aplicaciones todavía tienen que explorarse.

Finalmente en este apartado, es destacado el comportamiento similar del plasma desialilado y no desialilado en relación a pruebas globales de coagulación. La desialilación plasmática no afecta de forma significativa ni a los tiempos de coagulación (TTPa y TP) ni a la formación y degradación del coágulo de fibrina. La posible existencia de mecanismos compensatorios que justifiquen esta falta de efecto global podría ser planteada. El efecto en un elemento por ejemplo procoagulante podría ser compensado con un efecto similar con un elemento anticoagulante, como ocurre por ejemplo con la terapia anticoagulante con antagonistas de la vitamina K (Oldenburg *et al*, 2008) o en hepatopatías (Lisman *et al*, 2010). Sin embargo, creemos que el principal problema de estas pruebas es que emplean dosis extraordinariamente elevadas de activadores de la coagulación que provocan una activación masiva de la cascada de la coagulación que la hacen completamente insensibles a pequeños defectos funcionales que pudiera provocar la desialilación. Además, como discutiremos posteriormente, no debemos olvidar

que posiblemente un efecto notorio de la desialilación, la menor vida media de las proteínas desialiladas (Yang *et al*, 2015), no se tiene en cuenta en este modelo *in vitro*.

En relación al efecto de la desialilación en plaquetas de muestras incubadas con suero del mismo control y neuraminidasa en condiciones basales, nuestros resultados muestran un discreto aumento, pero significativo, de la expresión de CD63, sin cambiar la expresión de CD62. Este resultado sugiere que la desialilación de las proteínas de la superficie plaquetaria podría promover la degranulación de gránulos densos. Este resultado es contradictorio con el obtenido en un trabajo recientemente publicado, en el que no se encontraron diferencias ni en la concentración de mepacrina ni en la expresión de CD63 entre plaquetas expuestas o no a neuraminidas (Kullaya *et al*, 2018). No sabemos si el hecho de emplear una neuraminidasa diferente, aunque también de amplio espectro (NanA), que puede romper los ácidos siálicos con enlaces α -2,3, α -2,6-, y α -2,8 (Xu *et al*, 2011) pueda justificar estas discrepancias. En nuestro estudio, que incluye mayor número de muestras analizadas (37 frente a las 6 del estudio de Kullaya y cols) también empleamos mayores dosis de neuraminidasa (5 U/ml vs. 2 U/mL), y mostramos pruebas adicionales que sugieren una mayor actividad plaquetaria en las muestras desialiladas.

La aglutinación inducida por ristocetina requiere de la unión entre FvW y la GPIb plaquetaria facilitado por su propia carga positiva (Coller & Gralnick, 1977). La eliminación del ácido siálico podría contribuir a favorecer la reducción de la repulsión electrostática entre la GPIb α y el FvW, ambos cargados negativamente, dando lugar al aumento de la aglutinación mediada por ristocetina que

observamos. Por tanto, el efecto de una mayor aglutinación observada con dosis bajas de ristocetina en PRP desialilado podría ser explicado tanto por la desialilación de las glicoproteínas de la superficie plaquetaria, como por la desialilación del FvW, o por ambos. Hace más de tres décadas que se publicó la capacidad de aglutinación espontánea del FvW sin ácido siálico (asialo-FvW) (Cattaneo *et al*, 1988), y estudios posteriores confirman el importante papel de este azúcar en el ligando plaquetario (Ward *et al*, 2019). En nuestro modelo se eliminan los ácidos siálicos de forma global, tanto de las proteínas plasmáticas como de la superficie plaquetaria. La justificación del porqué la incubación de PPP desialilado con plaquetas no desialiladas no conduce a la aglutinación de las plaquetas la encontramos en la diferencia de concentración de FvW y FVIII. En nuestro modelo, la concentración de estas proteínas es fisiológica, mientras que es notablemente superior cuando se añade exógenamente a plaquetas lavadas: hasta 5 veces superior en asialo-FvW (Cattaneo *et al*, 1988) y hasta 500 veces superior en el caso de asialo-FVIII (De Marco & Shapiro, 1981). Desgraciadamente, no pudimos validar los resultados de aglutinación con los ensayos de citometría de flujo.

Otro aspecto a discutir es el aumento en la expresión de CD63 en plaquetas desialiladas. Se ha planteado que una potencial desialilación del FvW podría inducir la externalización de los gránulos densos plaquetarios (De Marco *et al*, 1985). Greenberg y colaboradores no observaron una degranulación plaquetaria sin activación de las muestras a diferencia de nuestros resultados, lo que podría deberse a que llevaron a cabo el tratamiento con neuraminidasa purificada en plaquetas lavadas resuspendidas posteriormente en tampón Tyrode o en plasma pobre de plaquetas citratado y por tanto, con un FvW con ácido siálico terminal

(Greenberg *et al*, 1975). En cualquier caso, debido al discreto aumento observado, no es esperable una degranulación relevante en condiciones basales.

Por otro lado, serían necesarios estudios adicionales que evaluaran el FvW en nuestro modelo, como por ejemplo cantidad y tipos de multímeros o sensibilidad a la degradación por ADAMTS13 (McGrath *et al*, 2010, 2013), especialmente atendiendo a las nuevas funciones que se asignan al ácido siálico en el FvW (Ward *et al*, 2019).

Los resultados de agregación se validaron con los obtenidos analizando marcadores de activación plaquetaria mediante citometría de flujo y que consolidan la idea que la eliminación del ácido siálico de la superficie plaquetaria o de las proteínas que interaccionan con la misma conduce a una mayor sensibilidad para la activación plaquetaria. Estos resultados son plenamente compatibles con los obtenidos mediante agregación con diferentes agonistas tras la desialilación de plaquetas lavadas (Greenberg *et al*, 1975). En nuestro modelo (desialilación de PRP) sólo observamos diferencias notables a nivel de LTA con ristocetina a dosis bajas y PAR-1 a dosis bajas. Ya hemos discutido los posibles mecanismos que pueden explicar la mayor sensibilidad a ristocetina. Sin embargo, no se conoce por el momento con claridad el mecanismo por el cual la pérdida de ácido siálico contribuiría al aumento de agregación mediada por trombina. Cuando se evaluó la activación mediante citometría, las dos dosis empleadas de PAR-1 mostraron una mayor unión a fibrinógeno en las plaquetas desialiladas. En las plaquetas, la señalización de la trombina está mediada por los PAR, receptores acoplados a la proteína G que desencadenan varias vías intracelulares, incluida la fosforilación de varias proteínas. Una comunicación presentada en el último congreso de la Sociedad Americana de Hematología (Prete A *et al*. ASH

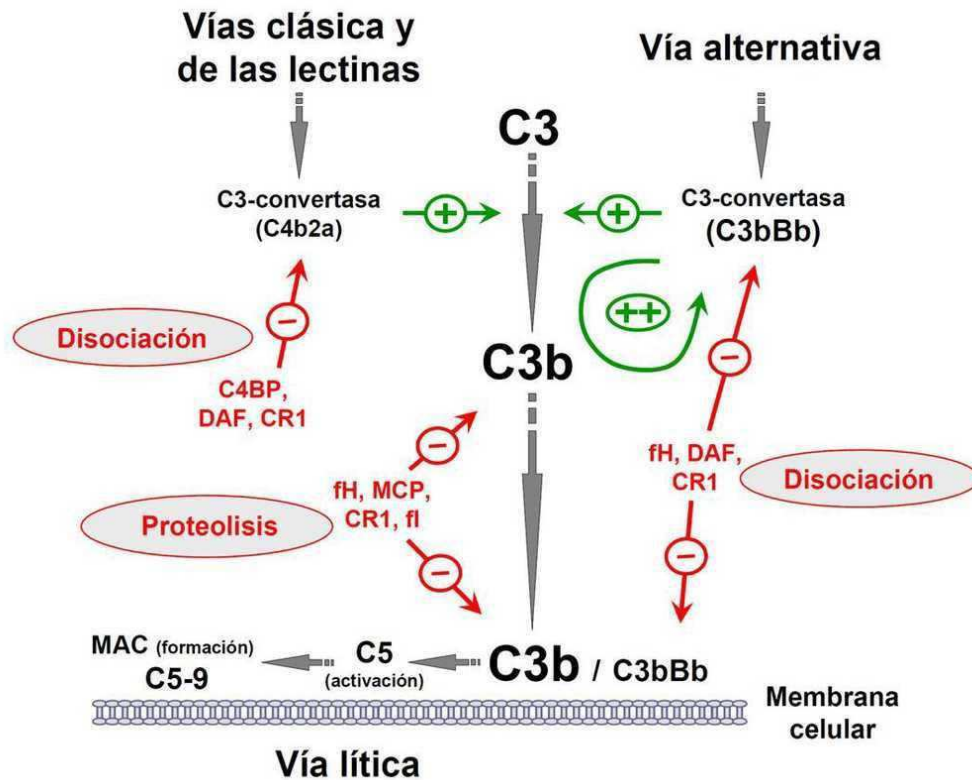
2018,#3730) mostró que la ausencia de ácido siálico en plaquetas lavadas provocaba un aumento significativo de la fosforilación en Akt tras activación con trombina (0,1 U/mL) y que el tratamiento previo de las plaquetas con un inhibidor de neuraminidasa (DANA) amortiguaba la señal de fosforilación desencadenada por la activación de la trombina. Estos resultados sugieren por primera vez que el estado de glicosilación de las glicoproteínas de la superficie en las plaquetas podría regular la activación inducida por la trombina y explicaría que en nuestro trabajo aumente la unión de fibrinógeno tras activar el PRP desialilado con PAR-1. De manera similar, en plaquetas expuestas a NanA (Kullaya *et al*, 2018), y estimuladas con TRAP (PAR-1) también se indujo una mayor unión del fibrinógeno, pero no tuvo lugar un incremento en la expresión de P-selectina. De hecho, de forma semejante a lo observado en plaquetas desialiladas por la neuraminidasa A del neumococo (Kullaya *et al*, 2018), en nuestro modelo la activación con ADP mostró una mayor expresión de P-selectina y unión a fibrinógeno que sus respectivos controles sin neuraminidasa, a pesar de no mostrar alteraciones visibles por LTA. El discreto aumento en la expresión del marcador de gránulos densos CD63 en la superficie de las plaquetas tratadas con neuraminidasa advertiría de la posible mayor secreción de ADP a partir de sus gránulos densos, por lo que a igual adición de ADP, la cantidad global de ADP (secretado + adicionado en el ensayo) que se uniría a P2Y₁₂ para ampliar la señal de activación de las plaquetas sería mayor en las plaquetas con neuraminidasa. El efecto observado tras la activación por CRP-XL, menos pronunciado que con ADP, pero con un notable aumento de la unión a fibrinógeno sería consecuencia de la secreción aumentada de ADP (Nieswandt *et al*, 2001). Consecuentemente, tanto los antagonistas del receptor de ADP (ticagrelor) como los inhibidores de

neuraminidasa (oseltamivir) han mostrado capacidad en prevenir la hiperreactividad plaquetaria inducida por NanA (Kullaya *et al*, 2018).

Finalmente para el apartado de plaquetas, la exposición a la neuraminidasa de las plaquetas lavadas e incubadas con suero autólogo, causó un aumento discreto en la unión de anticuerpos contra GPIIb α y GPIX; y sobre todo un mayor aumento en la unión de anticuerpos contra la integrina α IIf. Este efecto podría ser explicado, como ocurría para el FXII, porque la eliminación de los residuos expuestos de ácido siálico con carga negativa, pueda favorecer la interacción del anticuerpo con el antígeno o porque la activación plaquetaria facilita la exposición de la α IIf₃ del sistema canalicular.

En el último apartado de este capítulo quisimos evaluar el efecto del contenido en ácido siálico sobre la hemólisis de glóbulos rojos, considerando los recientes resultados relacionando este con el SHU (Hyvärinen *et al*, 2016). El SHU es una microangiopatía trombótica caracterizada por hemólisis intravascular, trombopenia e insuficiencia renal aguda que es resultado de una activación incontrolada del sistema del complemento (Figura 18).

Figura 18. Vías de activación del complemento.



Se diferencian tres tipos de SHU atendiendo a su etiología: típico, secundario y atípico (Jokiranta, 2017). El SHU típico es causado en hasta un 90% de los casos por alimentos contaminados con *Escherichia coli* enterohemorrágica productor de toxina Shiga, de ahí que se conozca como STEC-HUS (Salvadori & Bertoni, 2013). La subunidad B de la toxina Shiga (o toxina-like Shiga), una potente citotoxina, se une a glicolípidos específicos de la membrana celular, específicamente a globotriaosilceramida (Gb3). El dominio A se internaliza e induce la apoptosis de la célula afectada, causando daño o activación del endotelio, glóbulos rojos, y plaquetas (Jokiranta, 2017). Se piensa que la principal razón por la que la infección gastrointestinal afecta particularmente a los riñones es el tropismo tisular de la toxina Shiga debido a la fuerte expresión de Gb3 en el

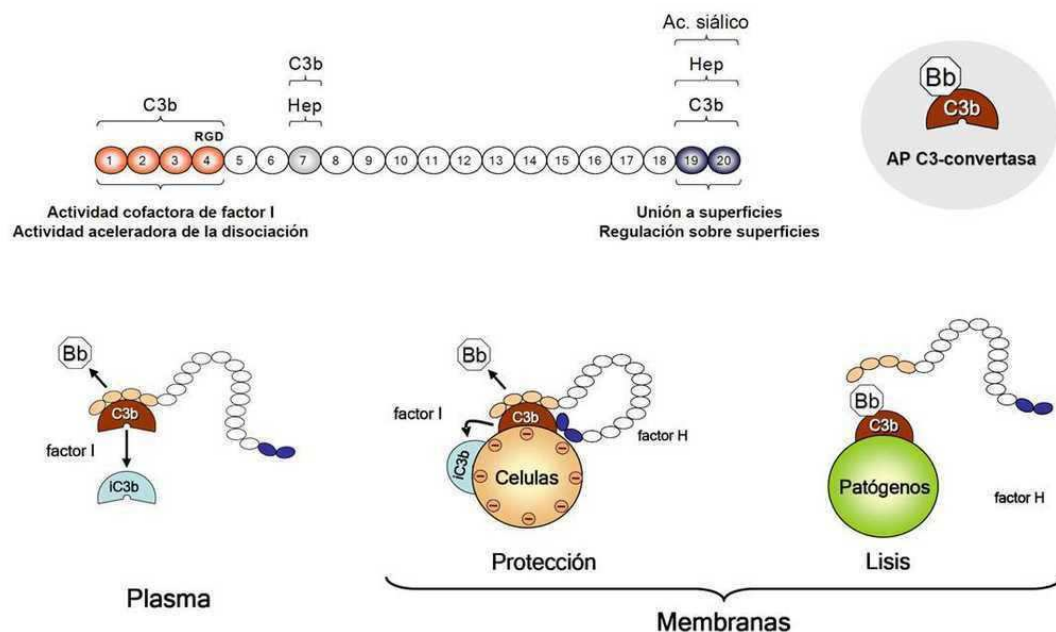
endotelio glomerular (Amaral *et al*, 2013). Se habla de SHU secundario cuando se inicia por una enfermedad o estado coexistente. Las causas más frecuentemente relacionadas incluyen infecciones; especialmente las causadas por *Streptococcus pneumoniae* (Szilágyi *et al*, 2013) y el virus de la influenza (Allen & Licht, 2011). Además de las infecciones, el SHU secundario puede estar asociado con el trasplante (de órgano sólido o de médula ósea), enfermedades autoinmunes, cáncer, embarazo, y el uso de ciertos fármacos citotóxicos. La característica común de estas condiciones coexistentes es que pueden causar daño celular directo, promover la activación del sistema del complemento en general o exacerbar la activación del complemento en células propias (Jokiranta, 2017).

En cambio el SHUa, no se asocia con infecciones ni con una enfermedad coexistente (Loirat *et al*, 2016). Generalmente se debe a la existencia de un defecto genético (hasta en un 50-60% de los casos de SHUa) en las proteínas reguladoras del complemento produciendo como resultado una activación incontrolada del complemento por diferentes mecanismos, incluidos los derivados de una enfermedad subyacente (Jokiranta, 2017). También se han descrito defectos adquiridos en hasta un 8-10% (anticuerpos anti-factor H). El gen más frecuentemente mutado es el del factor H (en un 20-30% de los casos SHUa), estando afectados en menor frecuencia otros genes: CD46, previamente conocida como proteína cofactor de membrana (5-15 %), factor I (4-10%), C3 (2-10%), factor B (1-4%), trombomodulina (3-5%) (Fremeaux-Bacchi *et al*, 2013). Las mutaciones del gen del factor H (FH), además de ser las más frecuentes, son las que se asocian a un peor pronóstico (Caprioli *et al*, 2006).

El FH del complemento junto con el factor I, compiten con el factor B por la unión a C3b y acelerar la desintegración de la convertasa de C3 (Figura 21). Se

han descrito alrededor de 100 mutaciones en el gen del FH, la mayoría de las cuales son mutaciones missense que no afectan los niveles de FH ni de C3 (Jokiranta *et al*, 2006). En estos pacientes, las mutaciones generalmente afectan la región C-terminal (los dominios 19 y 20), que son los que interaccionan con C3b, glucosaminoglicanos, heparina y células endoteliales (Figura 19) (Jokiranta *et al*, 2006).

Figura 19. Activación y regulación por factor H de la vía alternativa del complemento en el plasma y en superficies celulares.



En los últimos años, ha aumentado la comprensión general de los mecanismos patogénicos del SHU atípico, y los resultados obtenidos apuntan a un papel clave del ácido siálico (Hyvärinen *et al*, 2016). El FH se une por un lado al ácido siálico de las superficies de eritrocitos, células endoteliales y plaquetas; y por otro a la fracción C3b del complemento para prevenir el daño celular y la trombogénesis

características del SHUa (Figura 19). La alteración en el reconocimiento del ácido siálico de las superficies y de C3b a causa de las mutaciones en los dominios 19-20 del FH explica el desarrollo de SHUa (Hyvärinen *et al*, 2016).

Por ello, estudiamos el efecto que una desialilación completa en sangre pudiera tener en la hemólisis a través de la posible activación del complemento. En el ensayo empleando muestras de sujetos sanos, no observamos mayor susceptibilidad a la lisis mediada por complemento de hematíes tratados con sialidasa a diferencia de estudios previos (Yu J *et al*. ASH 2018,#3748). Es atractivo especular que esta variabilidad podría achacarse a diferencias interpersonales, y sería interesante evaluar la sensibilidad hemolítica en portadores de diferentes mutaciones en el FH que afectan a la interacción con el ácido siálico. Por esta razón nos pareció interesante estudiar el efecto de la sialidasa en un paciente con SHU postrasplante de progenitores hematopoyéticos. Los resultados obtenidos en dos momentos de la enfermedad de este paciente muestran que especialmente cuando se recalcifica la muestra, los hematíes desialilados presentan mayor hemólisis. La identificación de dos mutaciones patogénicas en el dominio 20 del FH podría apoyar la importancia de estos dominios (y su posible relación con la interacción ácido siálico y activación de complemento) en la patogenia del SHUa (Heinen *et al*, 2006).

Reconocemos que existen limitaciones en nuestro modelo, como son: 1) la funcionalidad plaquetaria evaluada tanto por LTA como por la expresión de P-selectina o la unión a fibrinógeno mediante citometría de flujo con diferentes agonistas se realizó en muestras con más de 12 horas de incubación por lo que los

resultados con determinados agonistas, especialmente a dosis bajas podrían estar infravalorados. No obstante, todos los resultados en controles tratados con neuraminidasa se comparan con el mismo control sometido a las mismas condiciones excepto sin neuraminidasa para evitar esta limitación; 2) como modelo *in vitro*, no podemos valorar las consecuencias de una desialilación sobre la vida media y aclaramiento tanto de proteínas desialiladas como de células con menor contenido de ácido siálico. Este aspecto se ha demostrado clave en plaquetas. 3) El ADP, que contribuye a la propagación de la activación de las plaquetas, se libera desde los gránulos densos de las plaquetas, pero también por las células endoteliales y por los hematíes; lo que podría tener un papel adicional en la fisiopatología del SHUa, lo cual no ha sido valorado en este trabajo. 4) Y por último, no se han evaluado otros factores relevantes en patología aterosclerótica que sin duda tendrían un papel *in vivo*, como son: el aumento de interacciones entre plaquetas y leucocitos debidas a la reducción de la carga electronegativa global en muestras desialiladas (Kullaya *et al*, 2018), la pérdida de la protección asociada a la reducción de lípidos plasmáticos proinflamatorios (White *et al*, 2018; Igdoura, 2017) y el nivel de sialilación de nuevos marcadores implicados en aterogenicidad como CD36 (Kawecki *et al*, 2019).

5. Conclusión

Este trabajo analiza el efecto de la desialilación global en hemostasia. Aunque los niveles de este componente pueden tener efecto en el reconocimiento inmunológico y en el aclaramiento de las proteínas hemostáticas, nuestro modelo indica que la pérdida de ácidos siálicos no tiene un impacto patogénico mayor en

dos proteínas evaluadas (antitrombina y FXII) ni en las pruebas globales analizadas (TTPA, TP y formación y degradación del coágulo). Sin embargo, la desialilación completa puede revertir parcialmente *in vitro* el efecto de ciertas mutaciones en la antitrombina que afectan la afinidad por heparina lo que abre interesantes perspectivas en el manejo de estos pacientes y en la aplicación clínica de concentrados de antitrombina con menor contenido de ácido siálico. Además, nuestro estudio demostró un estado de hiperreactividad plaquetaria si se produce desialilación, lo que podría ser contribuyente en pacientes con otros factores de riesgo adicionales a un estado protrombótico, especialmente a nivel arterial. Son precisos estudios adicionales que evalúen si inhibidores de neuraminidasa podrían disminuir la hiperreactividad plaquetaria y reducir la sensibilidad a la lisis por complemento en determinados pacientes fundamentalmente en portadores de ciertas variantes genéticas del FH.

6. Referencias

- Allen, U. & Licht, C. (2011) Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS--more than just another trigger? *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, **26**, 3–5.
- Amaral, M.M., Sacerdoti, F., Jancic, C., Repetto, H.A., Paton, A.W., Paton, J.C. & Ibarra, C. (2013) Action of shiga toxin type-2 and subtilase cytotoxin on human microvascular endothelial cells. *PloS one*, **8**, e70431.
- Bharadwaj, D., Harris, R.J., Kisiel, W. & Smith, K.J. (1995) Enzymatic removal of sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 6537–42.
- Björkqvist, J., de Maat, S., Lewandrowski, U., Di Gennaro, A., Oschatz, C., Schönig, K., Nöthen, M.M., Drouet, C., Braley, H., Nolte, M.W., Sickmann, A., Panousis, C., Maas, C. & Renné, T. (2015) Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *The Journal of clinical investigation*, **125**, 3132–46.
- Caprioli, J., Noris, M., Brioschi, S., Pianetti, G., Castelletti, F., Bettinaglio, P., Mele, C., Bresin, E., Cassis, L., Gamba, S., Porrati, F., Bucchioni, S., Monteferrante, G., Fang, C.J., Liszewski, M.K., Kavanagh, D., Atkinson, J.P., Remuzzi, G. & International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP (2006) Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*, **108**, 1267–79.
- Cattaneo, M., Mustard, J.F., Canciani, M.T., Richardson, M., Federici, A.B. & Mannucci, P.M. (1988) Conditions influencing the interaction of asialo von

Willebrand factor with human platelets--the effects of external ionized calcium concentration and the role of arachidonate pathway. *Thrombosis and haemostasis*, **60**, 280–8.

Coller, B.S. & Gralnick, H.R. (1977) Studies on the Mechanism of Ristocetin-Induced Platelet Agglutination. *Journal of Clinical Investigation*, **60**, 302–312.

Corral, J., Hernandez-Espinosa, D., Soria, J.M., Gonzalez-Conejero, R., Ordonez, A., Gonzalez-Porras, J.R., Perez-Ceballos, E., Lecumberri, R., Sanchez, I., Roldan, V., Mateo, J., Minano, A., Gonzalez, M., Alberca, I., Fontcuberta, J. & Vicente, V. (2007) Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood*, **109**, 4258–63.

Corral, J., Huntington, J.A., González-Conejero, R., Mushunje, A., Navarro, M., Marco, P., Vicente, V. & Carrell, R.W. (2004) Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **2**, 931–9.

Corral, J., de la Morena-Barrio, M.E. & Vicente, V. (2018) The genetics of antithrombin. *Thrombosis Research*, **169**, 23–29.

Corral, J., Rivera, J., Martínez, C., González-Conejero, R., Miñano, A. & Vicente, V. (2003) Detection of conformational transformation of antithrombin in blood with crossed immunoelectrophoresis: new application for a classical method. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **142**, 298–305.

Fremaux-Bacchi, V., Fakhouri, F., Garnier, A., Bienaimé, F., Dragon-Durey, M.-A., Ngo, S., Moulin, B., Servais, A., Provot, F., Rostaing, L., Burtey, S., Niaudet, P., Deschênes, G., Lebranchu, Y., Zuber, J. & Loirat, C. (2013) Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series

comparing children and adults. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, **8**, 554–62.

Greenberg, J., Packham, M.A., Cazenave, J.P., Reimers, H.J. & Mustard, J.F. (1975) Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **32**, 476–84.

Grewal, P.K., Aziz, P. V, Uchiyama, S., Rubio, G.R., Lardone, R.D., Le, D., Varki, N.M., Nizet, V. & Marth, J.D. (2013) Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 20218–23.

Grozovsky, R., Giannini, S., Falet, H. & Hoffmeister, K.M. (2015) Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood*, **126**, 1877–84.

Hansson, K. & Stenflo, J. (2005) Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, **3**, 2633–48.

Hardy, A.T., Palma-Barqueros, V., Watson, S.K., Malcor, J.-D., Eble, J.A., Gardiner, E.E., Blanco, J.E., Guijarro-Campillo, R., Delgado, J.L., Lozano, M.L., Teruel-Montoya, R., Vicente, V., Watson, S.P., Rivera, J. & Ferrer-Marín, F. (2018) Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*, **118**, 1009–1020.

Heinen, S., Sanchez-Corral, P., Jackson, M.S., Strain, L., Goodship, J.A., Kemp, E.J., Skerka, C., Jokiranta, T.S., Meyers, K., Wagner, E., Robitaille, P., Esparza-Gordillo, J., Rodriguez de Cordoba, S., Zipfel, P.F. & Goodship, T.H.J. (2006)

De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Human mutation*, **27**, 292–3.

Huntington, J.A., McCoy, A., Belzar, K.J., Pei, X.Y., Gettins, P.G. & Carrell, R.W. (2000) The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 15377–83.

Hyvärinen, S., Meri, S. & Jokiranta, T.S. (2016) Disturbed sialic acid recognition on endothelial cells and platelets in complement attack causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **127**, 2701–10.

Igdoura, S.A. (2017) Asialoglycoprotein receptors as important mediators of plasma lipids and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, **28**, 209–212.

Jokiranta, T.S. (2017) HUS and atypical HUS. *Blood*, **129**, 2847–2856.

Jokiranta, T.S., Jaakola, V.-P., Lehtinen, M.J., Päreäpalo, M., Meri, S. & Goldman, A. (2006) Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremic syndrome. *The EMBO journal*, **25**, 1784–94.

Kawecki, C., Bocquet, O., Schmelzer, C.E.H., Heinz, A., Ihling, C., Wahart, A., Romier, B., Bennasroune, A., Blaise, S., Terryn, C., Linton, K.J., Martiny, L., Duca, L. & Maurice, P. (2019) Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1: potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **76**, 791–807.

Koide, T., Odani, S., Takahashi, K., Ono, T. & Sakuragawa, N. (1984) Antithrombin

- III Toyama: replacement of arginine-47 by cysteine in hereditary abnormal antithrombin III that lacks heparin-binding ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 289–93
- Kullaya, V., de Jonge, M.I., Langereis, J.D., van der Gaast-de Jongh, C.E., Büll, C., Adema, G.J., Lefeber, D., Cremers, A.J., Mmbaga, B.T., de Groot, P.G., de Mast, Q. & van der Ven, A.J. (2018) Desialylation of Platelets by Pneumococcal Neuraminidase A Induces ADP-Dependent Platelet Hyperreactivity. *Infection and immunity*, **86**.
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M. & Ni, H. (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nature communications*, **6**, 7737.
- Li, Y. & Chen, X. (2012) Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, **94**, 887–905.
- Lisman, T., Caldwell, S.H., Burroughs, A.K., Northup, P.G., Senzolo, M., Stravitz, R.T., Tripodi, A., Trotter, J.F., Valla, D.-C., Porte, R.J. & Coagulation in Liver Disease Study Group (2010) Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *Journal of hepatology*, **53**, 362–71.
- Loirat, C., Fakhouri, F., Ariceta, G., Besbas, N., Bitzan, M., Bjerre, A., Coppo, R., Emma, F., Johnson, S., Karpman, D., Landau, D., Langman, C.B., Lapeyraque, A.-L., Licht, C., Nester, C., Pecoraro, C., Riedl, M., van de Kar, N.C.A.J., Van de Walle, J., Vivarelli, M., et al (2016) An international consensus approach to

the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatric Nephrology*, **31**, 15–39.

Makroo, R.N., Raina, V., Bhatia, A., Gupta, R., Majid, A., Thakur, U.K. & Rosamma, N.L. (2011) Evaluation of the red cell hemolysis in packed red cells during processing and storage. *Asian journal of transfusion science*, **5**, 15–7.

De Marco, L., Girolami, A., Russell, S. & Ruggeri, Z.M. (1985) Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation*, **75**, 1198–203.

De Marco, L. & Shapiro, S.S. (1981) Properties of human asialo-factor VIII. A ristocetin-independent platelet-aggregating agent. *The Journal of clinical investigation*, **68**, 321–8.

Martinelli, I., De Stefano, V. & Mannucci, P.M. (2014) Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nature reviews. Cardiology*, **11**, 140–56.

Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Østergaard, A., Gutiérrez-Gallego, R., Padilla, J., Bohdan, N., Miñano, A., Pascual, C., Martínez, C., de la Morena-Barrio, M.E., Aguila, S., Pedersen, S., Kristensen, S.R., Vicente, V. & Corral, J. (2012) Amelioration of the severity of heparin-binding antithrombin mutations by posttranslational mosaicism. *Blood*, **120**, 900–4.

McGrath, R.T., van den Biggelaar, M., Byrne, B., O’Sullivan, J.M., Rawley, O., O’Kennedy, R., Voorberg, J., Preston, R.J.S. & O’Donnell, J.S. (2013) Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood*, **122**, 4107–10.

McGrath, R.T., McKinnon, T.A.J., Byrne, B., O’Kennedy, R., Terraube, V., McRae,

- E., Preston, R.J.S., Laffan, M.A. & O'Donnell, J.S. (2010) Expression of terminal alpha2-6-linked sialic acid on von Willebrand factor specifically enhances proteolysis by ADAMTS13. *Blood*, **115**, 2666–73.
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Eckly, A., Schulte, V., Ohlmann, P., Cazenave, J.P., Zirngibl, H., Offermanns, S. & Gachet, C. (2001) Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood*, **97**, 3829–35.
- Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C. & Watzka, M. (2008) The vitamin K cycle. *Vitamins and hormones*, **78**, 35–62.
- Olds, R.J., Lane, D.A., Boisclair, M., Sas, G., Bock, S.C. & Thein, S.L. (1992) Antithrombin Budapest 3. An antithrombin variant with reduced heparin affinity resulting from the substitution L99F. *FEBS letters*, **300**, 241–6.
- Peterson, C.B. & Blackburn, M.N. (1985) Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding. *The Journal of biological chemistry*, **260**, 610–5.
- Revilla, N., Corral, J., Miñano, A., Mingot-Castellano, M.E., Campos, R.M., Velasco, F., Gonzalez, N., Galvez, E., Berrueco, R., Fuentes, I., Gonzalez-Lopez, T.J., de la Morena-Barrio, M.E., Gonzalez-Porras, J.R., Vicente, V. & Lozano, M.L. (2018) Multirefractory primary immune thrombocytopenia; targeting the decreased sialic acid content. *Platelets*. 8:1-9 [Epub ahead of print].
- Revilla, N., De La Morena-Barrio, M.E., Miñano, A., López-Gálvez, R., Toderici, M., Padilla, J., García-Avello, Á., Lozano, M.L., Lefeber, D.J., Corral, J. & Vicente, V. (2017) Transient desialylation in combination with a novel

antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. *Scientific Reports*, **7**, 44556.

Riswari, S.F., Tunjungputri, R.N., Kullaya, V., Garishah, F.M., Utari, G.S.R., Farhanah, N., Overheul, G.J., Alisjahbana, B., Gasem, M.H., Urbanus, R.T., de Groot, P.G., Lefeber, D.J., van Rij, R.P., van der Ven, A. & de Mast, Q. (2019) Desialylation of platelets induced by Von Willebrand Factor is a novel mechanism of platelet clearance in dengue. *PLoS pathogens*, **15**, e1007500.

Salvadori, M. & Bertoni, E. (2013) Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World journal of nephrology*, **2**, 56–76.

Sánchez-Guiu, I., Antón, A.I., Padilla, J., Velasco, F., Lucia, J.F., Lozano, M., Cid, A.R., Sevivas, T., Lopez-Fernandez, M.F., Vicente, V., González-Manchón, C., Rivera, J. & Lozano, M.L. (2014) Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **9**, 213.

Szilágyi, A., Kiss, N., Bereczki, C., Tálosi, G., Rácz, K., Túri, S., Györke, Z., Simon, E., Horváth, E., Kelen, K., Reusz, G.S., Szabó, A.J., Tulassay, T. & Prohászka, Z. (2013) The role of complement in *Streptococcus pneumoniae*-associated haemolytic uraemic syndrome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **28**, 2237–45.

Tello-Montoliu, A., Jover, E., Marín, F., Bernal, A., Lozano, M.L., Sánchez-Vega, B., Pastor, F.J., Hurtado, J.A., Valdés, M., Vicente, V. & Rivera, J. (2012) Influence of CYP2C19 polymorphisms in platelet reactivity and prognosis in an

- unselected population of non ST elevation acute coronary syndrome. *Revista espanola de cardiologia (English ed.)*, **65**, 219–26.
- Turk, B., Brieditis, I., Bock, S.C., Olson, S.T. & Björk, I. (1997) The oligosaccharide side chain on Asn-135 of alpha-antithrombin, absent in beta-antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change. *Biochemistry*, **36**, 6682–91.
- Ward, S., O’Sullivan, J.M. & O’Donnell, J.S. (2019) von Willebrand factor sialylation—A critical regulator of biological function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, jth.14471.
- Ward, S.E., O’Sullivan, J.M., Drakeford, C., Aguila, S., Jondle, C.N., Sharma, J., Fallon, P.G., Brophy, T.M., Preston, R.J.S., Smyth, P., Sheils, O., Chion, A. & O’Donnell, J.S. (2018) A novel role for the macrophage galactose-type lectin receptor in mediating von Willebrand factor clearance. *Blood*, **131**, 911–916.
- White, E.J., Gyulay, G., Lhoták, Š., Szewczyk, M.M., Chong, T., Fuller, M.T., Dadoo, O., Fox-Robichaud, A.E., Austin, R.C., Trigatti, B.L. & Igdoura, S.A. (2018) Sialidase down-regulation reduces non-HDL cholesterol, inhibits leukocyte transmigration, and attenuates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 14689–14706.
- Xu, G., Kiefel, M.J., Wilson, J.C., Andrew, P.W., Oggioni, M.R. & Taylor, G.L. (2011) Three *Streptococcus pneumoniae* Sialidases: Three Different Products. *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 1718–1721.
- Yang, W.H., Aziz, P. V, Heithoff, D.M., Mahan, M.J., Smith, J.W. & Marth, J.D. (2015) An intrinsic mechanism of secreted protein aging and turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, **112**, 13657–62.

Zhang, X.-H., Wang, Q.-M., Zhang, J.-M., Feng, F.-E., Wang, F.-R., Chen, H., Zhang, Y.-Y., Chen, Y.-H., Han, W., Xu, L.-P., Liu, K.-Y. & Huang, X.-J. (2015) Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. *Journal of Hematology & Oncology*, **8**, 116.

Conclusiones

1. Describimos por primera vez una desialilación global y transitoria de las proteínas plasmáticas asociadas a eventos trombóticos en una paciente. La disminución de la fuerte carga electronegativa de los ácidos siálicos terminales al modular las interacciones hemostáticas proteína-proteína, en combinación con una situación protrombótica fuerte, como la deficiencia congénita de antitrombina, podría aumentar el riesgo de trombosis, especialmente en territorio arterial.
2. La desialilación plaquetaria puede estar implicada en la patogenia y respuesta terapéutica de enfermos con trombopenia inmune primaria (PTI) multirefractaria. Los pacientes con PTI con positividad única para anticuerpos anti-GPIIb/IIIa y que presentan una marcada desialilación plaquetaria podrían ser identificados como malos respondedores a los tratamientos convencionales. Una posible estrategia terapéutica en estos casos podría ser un tratamiento combinado que incluya inhibidores de neuraminidasa.
3. La pérdida de ácidos siálicos no tiene un impacto mayor en la funcionalidad de la antitrombina, el factor XII, ni en pruebas globales de la coagulación (TTPA, TP, y formación y degradación del coágulo). Sin embargo, la desialilación completa puede revertir el efecto de ciertas mutaciones que afectaban la afinidad por heparina de la antitrombina y abre interesantes perspectivas en el manejo de estos pacientes y en la aplicación clínica de concentrados de antitrombina con menor contenido de ácido siálico.
4. Nuestro modelo de desialilación global *in vitro* valida la generación de un estado de hiperreactividad plaquetaria. Estos resultados abren la posibilidad de que en pacientes con otros factores de riesgo isquémico, la desialilación podría exacerbar su riesgo trombótico y que inhibidores de neuraminidasa pudieran

tener utilidad en disminuir dicha hiperreactividad plaquetaria sin aumentar el riesgo de sangrado.

5. La desialilación completa no afecta a la hemólisis inducida por activación del complemento de forma notable aunque debería evaluarse en sujetos con variantes del factor H que incrementan el riesgo de síndrome hemolítico urémico.

Anexo I

Los resultados presentados en esta Tesis se han difundido a la comunidad científica a través de los siguientes artículos y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

1. Publicaciones

1. Revilla N, de la Morena-Barrio ME, Miñano A, López-Gálvez R, Toderici M, Padilla J, García-Avello Á, Lozano ML, Lefeber DJ, Corral J, Vicente V. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. Sci Rep. 2017 Mar 17;7:44556. doi: 10.1038/srep44556.
2. Revilla N, Corral J, Miñano A, Mingot-Castellano ME, Campos RM, Velasco F, Gonzalez N, Galvez E, Berrueco R, Fuentes I, Gonzalez-Lopez TJ, de la Morena-Barrio ME, Gonzalez-Porras JR, Vicente V, Lozano ML. Multirefractory primary immune thrombocytopenia; targeting the decreased sialic acid content. Platelets. 2018 Oct 8:1-9. doi: 10.1080/09537104.2018.1513476. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30296193.

2. Comunicaciones a congresos internacionales

1. N. Revilla, M.E. de la Morena-Barrio, A. Miñano, J. Padilla, M. Toderici, R.l López-Gálvez, M.L. Lozano, V. Vicente, Dirk Lefeber, Javier Corral. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency

causes severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. 1st European Congress on Thrombosis and Haemostasis. La Haya, Países Bajos, 28-30 Septiembre 2016

2. Nuria Revilla, Inmaculada Heras, María Eugenia de la Morena-Barrio, Pastora Iniesta, Jose B Nieto, Javier Corral, Vicente Vicente, María Luisa Lozano. Effect of oseltamivir treatment on platelet counts. 22nd Congress European Hematology Association. Madrid, 22 -25 de junio, 2017
3. N. Revilla; R.M. Campos; F. Velasco; A. Minano; I. Fuentes; J. Rivera; I. Martinez-Martinez; M.E. de la Morena-Barrio; J. Corral; V. Vicente; M.L. Lozano. Oseltamivir for the treatment of ITP patients not responding to conventional treatment: biological characterization and clinical responses. 22nd Congress of the European Association of Haematology. Madrid, 22-25 Junio 2017
4. N. Revilla; R.M. Campos; A. Minano; F. Velasco; N. González; R. Ferrer; I. Fuentes; N. Bermejo; J.M. Bastida; J. Corral; V. Vicente; M.L. Lozano. Biological characterization of ITP patients that are non-responders to traditional therapies. 22nd Congress of the European Association of Haematology. Madrid, 22-25 Junio 2017

3. Comunicaciones a congresos nacionales

1. Revilla Calvo N., de la Morena-Barrio M.E., Toderici M., Miñano A., Lozano M.L., Padilla J., Vicente V., García-Avello Á., Corral J. Trombosis recurrente arterial y venosa asociada con una nueva deficiencia de

antitrombina (c.651-653delCAT) y defecto de sialilación transitorio. LVII Congreso Nacional SEHH y XXXI Congreso Nacional SETH. Valencia, 22 al 24 Octubre de 2015.

2. Revilla N, Campos RM, Miñano A, Velasco F, González N, Ferrer R, Fuentes I, Bermejo N, Bastida JM, Corral J, Vicente V, Lozano ML. Características biológicas de pacientes con PTI sin respuesta a tratamientos específicos para la disminución de la destrucción mediada por receptores inmunes. LVIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXII Congreso Nacional de la SETH. Santiago de Compostela, 20 al 22 de octubre de 2016.
3. Revilla N, Campos RM, Velasco F, Miñano A, Fuentes I, Rivera J, Martínez-Martínez I, de la Morena Barrio M^a E., Corral J, Vicente V, Lozano M^a L. Respuesta clínica y cambios biológicos tras el tratamiento con oseltamivir en pacientes con PTI sin respuesta a tratamiento convencional. LVIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXII Congreso Nacional de la SETH. Santiago de Compostela, 20 al 22 de octubre de 2016.
4. Revilla N, Heras I, De la Morena-Barrio M^a.E, Iniesta P, Nieto José B, Corral J, Vicente V, Lozano M^a L. Estudio retrospectivo del efecto del tratamiento con Oseltamivir sobre el recuento plaquetario. LVIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXII Congreso Nacional de la SETH. Santiago de Compostela, 20 al 22 de octubre de 2016.

5. Revilla N, López Gálvez R, de la Morena Barrio, M^a. E, López Lera A, Miñano A, Vicente V, Lozano ML, Corral J. Papel del ácido siálico en el sistema hemostático: Resultados de un modelo *in vitro*. LX Congreso de la SEHH y XXXIV Congreso de la SETH. Granada, 11-13 de octubre de 2018.

4. Premios

1. Revilla Calvo N., de la Morena-Barrio M.E., Toderici M., Miñano A., Lozano M.L., Padilla J., Vicente V., García-Avello Á., Corral J. Trombosis arterial y venosa recurrente asociado con una nueva deficiencia de antitrombina y un defecto de sialización. Selección como una de las mejores comunicaciones para su presentación en el II Curso de Residentes organizado por la Fundación Española de Trombosis y Hemostasia. Coordinado por Dr. J.Corral y Dr. P.Domènech. Fecha: 15 de junio de 2015. Hospital Universitario La Paz, Madrid.
2. Revilla N, de la Morena-Barrio ME, Miñano A, López-Gálvez R, Toderici M, Padilla J, García-Avello Á, Lozano ML, Lefeber DJ, Corral J, Vicente V. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. Comunicación oral premiada en II Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca, Murcia 27 de noviembre, 2017.

Resumen en inglés

Changes in the levels of serum and cellular sialic acid, which may be associated to a prothrombotic state related to atherosclerosis may be implied in a number of hemostatic disorders.

In this study, we aimed to analyze sialic acid content in (1) a patient with a particularly severe thrombotic defect, (2) a cohort of multirefractory immune thrombocytopenia (ITP) patients, (3) normal individuals and specific patients (antithrombin deficiency, atypical hemolytic uremic syndrome) to investigate a possible role on global and distinct hemostatic pathways.

In the first section, we carried out a detailed and sequential analysis of samples from a patient suffering from early and recurrent venous and arterial thrombosis. We performed thrombophilic tests, biochemical, functional, genetic and glycomic analysis of antithrombin and other plasma proteins. The patient carried a new type I antithrombin mutation (p.Ile218del), whose structural relevance was verified in a recombinant model. Experiments with N-glycosidase F and neuraminidase suggested a nearly full desialylation of plasma proteins, which was confirmed by mass spectrometry analysis of transferrin glycoforms. However, partial desialylation and normal patterns were detected in samples collected at other time-points. Desialylation was noticeable after arterial events and was associated with low antithrombin activity, reduced platelet count and glomerular filtration rate. This is the first description of a global and transient desialylation of plasma proteins associated with thrombosis. The decrease in the strong electronegative charge of terminal glycans may modulate hemostatic protein-protein interactions, which in combination with a strong prothrombotic situation, such as antithrombin deficiency, could increase the risk of thrombosis.

In the second section of this work, we focused in patients with multirefractory ITP, since recent data suggest that specific anti-platelet antibodies may cause destruction of platelets by favoring platelet loss of sialic acid. In this multicenter study 35 patients with ITP, including 16 with multirefractory disease, were analyzed for antiplatelet-antibodies, thrombopoietin (TPO) levels, and platelet desialylation. In selected cases, responses to a novel treatment strategy using oseltamivir were tested. We found that antibodies against GPIb α were overrepresented in multirefractory patients compared to responders ($n = 19$). In contrast to conventional ITP patients, multirefractory patients exhibited a significant increased platelet activation state (granule secretion) and desialylation (RCA-1 binding) ($p < 0.05$), and a trend toward higher plasma TPO concentrations. The decreased sialic acid content seemed to be restricted to platelet glycoproteins, since other plasma proteins were not hypoglycosylated. A total of 10 patients with multirefractory ITP having remarkable loss of platelet terminal sialic acids were given oseltamivir phosphate. When the antiviral drug was combined with TPO receptor agonists (TPO-RAs) or with immunosuppressant drugs, platelet responses were observed in 66.7% of patients. All responding patients presented with antibodies reactive only against GPIb α . These findings suggest that desialylation may play a key pathogenic role in some multirefractory ITP patients, and provide diagnostic tools for the identification of such patients. Furthermore, we show that sialidase inhibitor treatment in combination with therapies that help to increase platelet production can induce sustained platelet responses in some patients with anti-GPIb α -mediated thrombocytopenia that have failed previous therapies.

Sialic acids are also critical for factor H-mediated complement regulation on endothelial cells, erythrocytes, and platelets. Additionally, recent data suggest that soluble exogenous neuraminidase can desialylate platelets, leading to platelet hyperreactivity. In the third section of this study, we developed an *in vitro* model of global desialylation to evaluate effects on key coagulation proteins and on complex hemostatic processes such as coagulation, fibrinolysis, platelet activation and the susceptibility to complement-mediated hemolysis. Enzymatic removal of sialic acid from human antithrombin and factor XII had no effect on their coagulant activity. Global coagulation tests (prothrombin time, activated partial thromboplastin time, clot formation, and fibrinolysis) were similar than samples without neuraminidase treatment. However, complete desialylation reverse the effect of certain mutations in antithrombin that affect the heparin affinity. These findings suggest the possibility of testing antithrombin concentrates with lower sialic acid content in these specific patients. Furthermore, platelet studies validate that treatment with neuraminidase leads to platelet hyperreactivity. These results suggests that in patients with other ischemic risk factors, desialylation could exacerbate their thrombotic risk and that neuraminidase inhibitors may be useful in decreasing platelet hyperreactivity without increasing the risk of bleeding. Finally, complete desialylation does not seem to significantly affect hemolysis, although a more detailed analysis is warranted in patients with factor H polymorphisms that increase the risk of hemolytic uremic syndrome.

Resumen en castellano

Se ha sugerido la relevancia del ácido siálico en los niveles y la función de las proteínas hemostáticas, pero hay pocos estudios disponibles.

Nuestro objetivo fue analizar el contenido de ácido siálico y sus consecuencias funcionales en diferentes elementos hemostáticos en tres contextos.

En el primer capítulo, estudiamos una paciente con trombosis recurrentes. Realizamos pruebas trombofílicas, análisis bioquímicos, funcionales, genéticos y glicómicos de antitrombina y otras proteínas plasmáticas en muestras seriadas. La paciente presentaba una nueva mutación en *SERPINC1* (p.Ile218del), cuya asociación con una deficiencia de antitrombina tipo I se verificó en un modelo recombinante. Se observó una desialilación casi completa de proteínas plasmáticas mediante Western blot y experimentos con N-glicosidasa F y neuraminidasa, que se confirmó mediante espectrometría de masas para las glicoformas de transferrina. Sin embargo, se detectó desialilación parcial y patrones normales en muestras recogidas en otros momentos. Esta es la primera descripción de una desialilación global y transitoria de proteínas plasmáticas asociadas con trombosis. La disminución en la fuerte carga electronegativa asociada con la desialilación puede modular las interacciones proteína-proteína hemostáticas, lo que en combinación con una situación protrombótica grave, como la deficiencia de antitrombina, podría aumentar el riesgo de trombosis.

En el segundo capítulo, realizamos un estudio multicéntrico de 35 pacientes con trombocitopenia inmune (PTI), 16 con PTI multirrefractaria. Datos recientes sugieren que anticuerpos antiplaquetarios específicos pueden causar la destrucción de las plaquetas al favorecer la pérdida de ácido siálico. Analizamos los anticuerpos antiplaquetarios, los niveles de trombopoyetina (TPO) y la desialilación de plaquetas. En 10 casos, se evaluó la respuesta a un nuevo

tratamiento con oseltamivir (antiviral inhibidor de neuraminidasa). Descubrimos que los anticuerpos contra GPIIb α estaban sobrerrepresentados en pacientes multirefractarios, quienes también presentaron un aumento significativo del estado de activación plaquetaria (secreción de gránulos) y desialilación (unión a RCA-1, restringida a plaquetas ya que las proteínas plasmáticas no estaban desialiladas), y una tendencia a niveles mayores de TPO. Cuando el oseltamivir se combinó con agonistas del receptor de TPO (TPO-RA) o con fármacos inmunosupresores, se observaron respuestas plaquetarias en el 66,7% de los pacientes. Todos los pacientes que respondieron presentaron anticuerpos reactivos solo contra GPIIb α . Estos hallazgos sugieren que la desialilación puede desempeñar un papel patogénico clave en algunos pacientes con PTI multirrefractaria y proporcionar herramientas de diagnóstico para su identificación. Además, mostramos que el tratamiento con oseltamivir en combinación con terapias que ayudan a aumentar la producción de plaquetas puede inducir respuestas plaquetarias sostenidas en algunos pacientes con trombocitopenia mediada por anti-GPIIb α sin respuesta a terapias previas.

En el tercer capítulo desarrollamos un modelo *in vitro* de desialilación completa para estudiar su efecto sobre las proteínas clave de la coagulación y en procesos hemostáticos complejos como la coagulación, la fibrinólisis, la activación plaquetaria y la susceptibilidad a la hemólisis mediada por el complemento. La antitrombina y el factor XII desialilados mantuvieron su actividad. Las pruebas de coagulación global (tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, formación de coágulos y fibrinólisis) fueron similares en muestras con o sin tratamiento con neuraminidasa. Sin embargo, la desialilación completa revirtió el efecto de ciertas mutaciones en la antitrombina que afectan la afinidad por la

heparina. Además, la desialilación *in vitro* causa hiperreactividad plaquetaria. Estos resultados sugieren que en pacientes con otros factores de riesgo isquémico, la desialilación podría exacerbar su riesgo trombótico, y que los inhibidores de la neuraminidasa pueden ser útiles para disminuir la hiperreactividad plaquetaria sin aumentar el riesgo de sangrado. Finalmente, la desialilación completa no afectó significativamente la hemólisis, aunque se justifica un análisis más detallado en pacientes con variantes de factor H que aumentan el riesgo de síndrome urémico hemolítico.