



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Posgrado en Inmunología

**“Caracterización de la expresión de Defensina Alfa 1 en
plaquetas y megacariocitos humanos”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias en Inmunología

P R E S E N T A

M. en C. Xareni Raquel Valle Jiménez

Directores de Tesis

Dra. en C. Jeanet Serafín López

Dr. en C. Sergio Roberto Aguilar Ruíz



Ciudad de México

Julio 2020

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biomedicina Experimental en la Facultad de Medicina y Cirugía de la “Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca”; en el Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis del Departamento de Inmunología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del “Instituto Politécnico Nacional” y en el Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de Arbovirus de la Unidad de Biomedicina en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la “Universidad Autónoma Nacional de México”; con el financiamiento de CONACyT, a través de la convocatoria de Ciencia Básica para Jóvenes Investigadores 2013-2014 (proyecto número: 223607); y el apoyo del Laboratorio Nacional de Citometría (LabNaICit).

AGRADECIMIENTOS. DEDICATORIAS.

Este trabajo está dedicado a mi abuela y a mi madre, ambas son la razón de que haya llegado tan lejos.

Agradezco a mis directores y a mi comité por el tiempo que han invertido en mí, así como a todos mis compañeros con los que tuve el gusto de trabajar, además de haberme ayudado a crecer en el ámbito profesional como en el personal.

Gracias a todas las personas que me han acompañado hasta el día de hoy y a las que se quedaron en el camino, siempre estarán presentes.

Índice general

	Pág.
Índice general	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumen.....	vii
<i>Abstract</i>	viii
1. Introducción	1
1.1. Trombopoyesis y transferencia de moléculas a partir del Megacariocito.....	1
1.2. Proteínas plaquetarias.....	3
1.3. Transcriptoma de las plaquetas.	5
1.4. Las plaquetas y la inmunidad innata.	7
1.5. Proteínas con actividad antimicrobiana en plaquetas.	10
1.6. Antecedentes directos.	12
2. Justificación	15
3. Planteamiento del problema.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	18
6. Materiales y métodos.....	19
6.1. Material biológico.	19
6.2. Obtención de plaquetas de sangre periférica.	19
6.3. Obtención de partículas tipo plaqueta a partir de células Meg-01.....	20
6.4. Tinción de Wright.	20
6.5. Extracción de RNA total.....	20
6.6. Determinación de Defensina Alfa 1 por medio de PCR en punto final y tiempo real.....	21
6.7. Determinación de Defensina Alfa 1 mediante citometría de flujo.	22
6.8. Localización de Defensina Alfa 1 mediante microscopía confocal.....	23
6.9. Ensayos de liberación de Defensina Alfa 1.....	23
6.10. Ensayos de interiorización de Defensina Alfa 1	24
6.11. Determinación de la actividad antimicrobiana de Defensina Alfa 1 secretada por plaquetas.....	24
6.12. Pruebas Estadísticas	25

7. Resultados	26
7.1. Las plaquetas de sangre periférica y las células Meg-01 contienen el RNA mensajero de Defensina Alfa 1.....	26
7.2. Las plaquetas y las células Meg-01 contienen Defensina Alfa 1 a nivel de proteína.	27
7.3. Las plaquetas y células Meg-01 contienen Defensina Alfa 1 en sus gránulos alfa.....	27
7.4. La estimulación con TPO en las células Meg-01 induce la producción de partículas tipo plaqueta (PLP).....	28
7.5. Las células Meg-01 pueden transferir Defensina Alfa 1 a sus PLPs.....	30
7.6. Las Partículas tipo Plaqueta pueden interiorizar Defensina Alfa 1 del medio	32
7.7. Las plaquetas, las células Meg-01 y las partículas tipo plaqueta secretan Defensina Alfa 1 posterior a su activación con diferentes agonistas.....	35
7.8. La Defensina Alfa 1 secretada por las plaquetas tiene actividad antimicrobiana hacia <i>Escherichia coli</i>	36
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	46
10. Bibliografía.....	47
ANEXOS	54
ANEXO I. Carta de aprobación del comité de ética.....	54
ANEXO II. Carta de consentimiento informado.....	55
ANEXO III. Portada del artículo.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las proteínas microbicidas que contienen las plaquetas.....	11
Tabla 2. Genes asociados a proteínas microbicidas sobreexpresados en plaquetas activadas.....	13
Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación los genes de β -actina y defensina alfa 1	22

Índice de figuras

Figura 1. Trombopoyesis.....	2
Figura 2. Factores que contienen las plaquetas y su localización.....	4
Figura 3. Participación de las plaquetas en la respuesta inmunológica.	8
Figura 4. Expresión del mRNA de Defensina Alfa 1 en plaquetas y en células Meg-01.....	26
Figura 5. Determinación de la proteína de Defensina Alfa 1 en plaquetas y células Meg-01 por citometría de flujo.	28
Figura 6. Localización de Defensina Alfa 1 en plaquetas y células Meg-01.....	29
Figura 7. Cambios morfológicos inducidos con trombopoyetina en las células Meg-01.....	30
Figura 8. Comparación de tamaño y expresión de CD41 entre plaquetas y partículas tipo plaquetas.	31
Figura 9. Comparación de la expresión de Defensina Alfa 1 entre células Meg-01 y sus partículas tipo plaquetas diferenciadas. C	32
Figura 10.- Evaluación de la capacidad de interiorización de la Defensina Alfa 1 en partículas tipo plaqueta.	35
Figura 11.- Ensayos de liberación de Defensina Alfa 1 por de las células Meg-01, partículas tipo plaquetas y plaquetas de sangre periférica.....	37
Figura 12.- Cinética de la actividad antimicrobiana de Defensina Alfa 1 plaquetaria contra <i>Escherichia coli</i>	38

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosin difosfato
AMP	Péptidos antimicrobianos
BPI	Proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad
cDNA	DNA complementario
CFU	Unidad formadora de colonias
DEFA1	Defensina alfa 1
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
GFP	Proteína verde fluorescente
hBD-1	Defensina beta 1
HDP	Proteínas para la defensa del hospedero
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MFI	Intensidad media de fluorescencia
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensajero
NET	Trampa extracelular de neutrófilos
NK	Células asesinas naturales
PAF	Factor asociado a plaquetas
PBP	Proteína básica plaquetaria
PBS	Regulador fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivados de plaquetas
PF4	Factor plaquetario 4
PK	Quinocidina plaquetaria
PLP	Partículas tipo plaqueta
PMP	Proteínas microbidas plaquetarias
PRP	Plasma rico en plaquetas
PRR	Receptores para el reconocimiento de patrones
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SD	Desviación estándar
TC	Trombocidina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
tPMP	Proteínas plaquetarias microbidas inducidas por trombina
TPO	Trombopoyetina
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

Resumen

Las plaquetas son células con la capacidad de llevar a cabo diversas funciones en la respuesta inmunológica innata. Diversos estudios han demostrado la capacidad de liberación de proteínas microbicidas plaquetarias (PMP), proteínas derivadas de la estimulación con trombina (tPMP) y péptidos antimicrobianos (AMP), de los cuales sólo se han descrito la defensina beta 1 y catelicidina. Recientemente, los resultados obtenidos a través de un microarreglo de expresión génica realizado para comparar el perfil de RNAs mensajeros entre plaquetas en estado basal y plaquetas activadas por un proceso inflamatorio/infeccioso sugirieron que las plaquetas podrían contener otros péptidos antimicrobianos, como las defensinas de la familia alfa. El objetivo del presente trabajo es el de evaluar y caracterizar la expresión de defensina alfa 1 (DEFA1) en plaquetas y megacariocitos humanos.

Los resultados demuestran la presencia del RNA mensajero y la proteína de DEFA1 en plaquetas de sangre periférica y en células Meg-01, línea celular de megacarioblastos humanos. Mediante microscopía confocal y tinciones con anticuerpos dirigidos hacia DEFA1 y Selectina-P, proteína de adhesión que se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas en estado basal, confirmamos que este péptido antimicrobiano se encuentra en los gránulos alfa plaquetarios, mientras que en las células Meg-01 se almacena en los gránulos alfa y citoplasma. Además, a través de ensayos *in vitro*, utilizando el modelo de partículas tipo plaqueta (PLP) en el cual se induce la maduración de las células Meg-01 mediante la estimulación con trombopoyetina (TPO) y se extraen sus PLPs por centrifugación, observamos que las células Meg-01 pueden transferir el RNA mensajero de DEFA1 a sus PLPs diferenciadas. Así mismo, confirmamos que tanto las plaquetas como las células Meg-01 son capaces de secretar DEFA1 al medio cuando son activadas con sus principales agonistas: trombina, adenosin difosfato (ADP) y lipopolisacárido (LPS), inclusive, los megacariocitos son capaces de secretar DEFA1 durante su proceso de maduración inducido con TPO. Finalmente, se comprobó el potencial antimicrobiano de la defensina secretada por plaquetas, para ello se realizaron cinéticas de actividad microbicida contra *Escherichia coli* utilizando los sobrenadantes, con o sin DEFA1, de plaquetas que fueron activadas con trombina, donde observamos que al eliminar DEFA1 de todas las proteínas que libera la plaqueta incrementa significativamente la proliferación de las bacterias.

En conclusión, tanto plaquetas como megacariocitos humanos son capaces de expresar, almacenar y liberar DEFA1. Este péptido antimicrobiano es secretado en su forma activa y es capaz de llevar a cabo su función biológica antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, en específico *E. coli*. Esto podría ser evidencia de una función desconocida por parte de las plaquetas y megacariocitos en la respuesta inmune innata.

Abstract

Platelets are cells with the capacity to execute different functions in the innate immunity response. Diverse studies have demonstrated that platelets can release platelet microbicide proteins (PMP), thrombin-induced platelet microbicide proteins (tPMP) and antimicrobial peptides (AMP), from which only defensin beta 1 and cathelicidin have been described. Recently, the results obtained through a gene expression microarray made to compare the profile of messenger RNAs between platelets at baseline and platelets activated by an inflammatory or infectious stimuli suggested that platelets could contain other antimicrobial peptides, such as defensins of the alpha family. The objective of this work was to evaluate and characterize the expression of defensin alpha 1 (DEFA1) in human platelets and megakaryocytes.

The results demonstrate the presence of mRNA and protein of DEFA1 in peripheral blood platelets and in Meg-01 cells, a cell line of human megakaryoblast. By confocal microscopy and staining with antibodies directed towards DEFA1 and Selectin-P, an adhesion protein found in the platelet alpha granules at basal state, we confirm that this antimicrobial peptide colocalize with platelet alpha granules, while in Meg-01 cells is colocalized in their alpha granules and cytoplasm. In addition, through *in vitro* assays, using the platelet-like particle (PLP) model in which maturation of Meg-01 cells is induced by thrombopoietin (TPO) stimulation and their PLPs are purified by centrifugation, we also observed that Meg-01 cells can transfer the mRNA of DEFA1 to their differentiated PLPs. Likewise, we confirm that both platelets and Meg-01 cells are capable of secreting DEFA1 to the medium when they are activated with their main agonists: thrombin, adenosine diphosphate (ADP) and lipopolysaccharide (LPS), and in addition, megakaryocytes are capable of secreting DEFA1 during their maturation process induced with TPO. Finally, the antimicrobial potential of platelet-secreted defensin was evaluated. For this purpose, the kinetics of the microbicidal activity against *Escherichia coli* was performed using the supernatants, with or without DEFA1, of platelets that were activated with thrombin. We observed that by eliminating DEFA1 from all the proteins released by the platelets significantly increases the proliferation of bacteria.

In conclusion, platelets and human megakaryocytes are able to express, store and release DEFA1. This antimicrobial peptide is secreted in its active form and is capable of carrying out its biological antimicrobial function against Gram-negative bacteria, specifically *E. coli*. This could be evidence of a previously unknown role for platelets and megakaryocytes in the innate immune response.

1. Introducción

Las plaquetas son pequeñas células (aproximadamente 2 μm de diámetro) que se derivan de los megacariocitos dentro de la médula ósea. Su papel fisiológico primario es el de detectar y reparar daños en el endotelio vascular. Durante una lesión vascular, el colágeno y diversas proteínas de la matriz extracelular serán expuestas a las plaquetas en circulación, promoviendo su unión y su activación. La adhesión estable al colágeno promueve la liberación de muchos mediadores solubles del almacén intracelular de las plaquetas, desencadenando el reclutamiento y activación de éstas mismas. Estos eventos son controlados por interacciones complejas que involucran a varias familias de moléculas, incluyendo: selectinas, integrinas, lípidos y citocinas. Junto con los leucocitos y los eritrocitos, las plaquetas activadas crean un agregado celular que impide la pérdida de sangre (1,2).

En la sangre de un humano adulto hay aproximadamente un trillón de plaquetas y debido a que el tiempo de vida media de estas células es de alrededor de 8 a 10 días, 100 billones de éstas deben ser producidas diariamente de los megacariocitos en la médula ósea para mantener las cuentas normales ($150\text{-}400 \times 10^9$ plaquetas por litro de sangre). Ya que sus números son extremadamente altos y tienen la capacidad de liberar mediadores inflamatorios, las plaquetas pueden cumplir la función de centinelas y rápidamente comunicarse con diversas células del sistema inmunológico (3).

1.1. Trombopoyesis y transferencia de moléculas a partir del Megacariocito.

La producción de plaquetas requiere de una progresión compleja de eventos, proceso conocido como trombopoyesis, que culminan con un solo megacariocito liberando cientos de plaquetas a la circulación. Los megacariocitos producen plaquetas al modificar su citoplasma en largas extensiones llamadas proplaquetas, las cuales, morfológicamente parecen cadenas de perlas. Aunque los megacariocitos residen en la médula ósea, sus proplaquetas se extienden a través de las uniones endoteliales de los vasos sanguíneos, en donde son liberadas a la circulación y luego son fragmentadas en plaquetas individuales (4) (Figura 1).

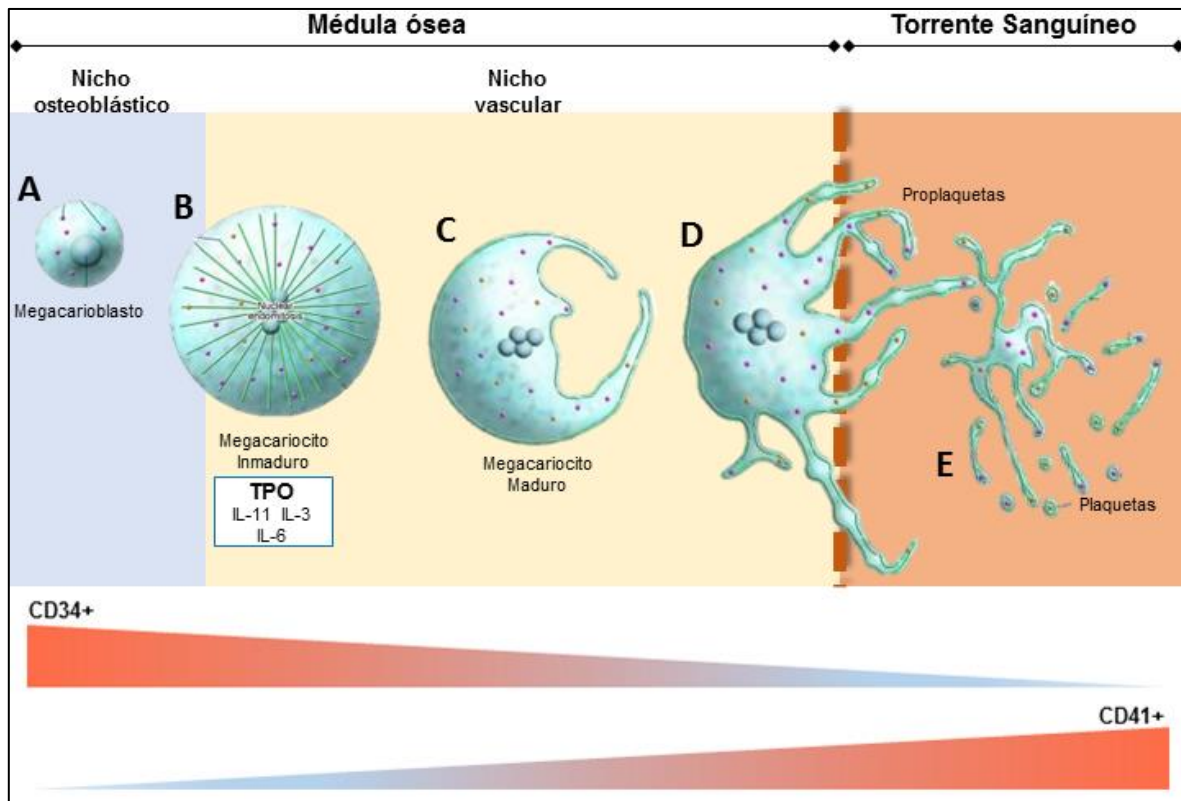


Figura 1. Trombopoyesis. El proceso de producción de plaquetas inicia con un megacarioblasto en el nicho osteoblástico de la médula ósea (A), el cual, tras un proceso de maduración, da lugar a un megacariocito inmaduro con la capacidad de migrar al nicho vascular de la médula ósea donde recibe los estímulos de TPO, interleucina 11, 3 y 6 (B). De 4 a 10 horas después de la estimulación se observan cambios morfológicos drásticos que incluyen: endomitosis nuclear, síntesis de organelos y gránulos, y la remodelación del citoplasma. La célula pierde su expresión de CD34 e incrementa su expresión de CD41. La matriz de microtúbulos emerge de los centrosomas y migra a la periferia para formar pseudópodos (C). Organelos y gránulos migran a través de los microtúbulos mientras los pseudópodos continúan elongándose progresivamente para formar los procesos proplaquetarios del lado vascular del seno medular, donde serán liberados (D). Finalmente, el núcleo será expulsado de la masa de proplaquetas y las plaquetas serán liberadas mediante fragmentación en los puntos de constricción (E).

A pesar de su carencia de núcleo, las plaquetas contienen microRNAs (miRNA) y RNA mensajeros (mRNA) en su citoplasma que pudieron haber sido heredados del megacariocito. Sin embargo, las plaquetas tienen una estructura membranal única que permite el transporte de microvesículas y pequeñas moléculas dejando la posibilidad de que parte de su repertorio de RNA citoplasmático provenga de otras células en sangre periférica, inclusive este repertorio podría ser transportado de la plaqueta a otras células nucleadas. Para evaluar este último punto, el grupo de Risitano *et al.* utilizó células Meg-01, línea celular de megacarioblastos, a las cuales se les transfeció el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y mediante la estimulación con trombopoyetina (TPO) generó partículas tipo plaqueta (PLP), por medio de RT-PCR comprobaron que las PLPs

contenían el mRNA de GFP, confirmando la transferencia de material genético de las células Meg-01 a sus PLPs. Al mismo tiempo, cocultivaron las PLP-GFP+ con células THP-1 y células HUVEC, los resultados obtenidos demostraban que las PLPs eran capaces de interiorizarse en las células y de transferir su mRNA, el cual era traducido a proteína por las células nucleadas. Lo anterior indica que las plaquetas, además de recibir el RNA del megacariocito, poseen la capacidad de transferir RNA citosólico a otras células, sugiriendo una nueva función para el transcriptoma plaquetario en cuanto a la regulación celular (5).

Las células hematopoyéticas de los linajes mieloides y linfoides son conocidas por ser importantes fuentes de una variedad de citocinas inflamatorias. A través de RT-PCR se han detectado las citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-1 β , IL-3 e IL-6 en megacariocitos primarios, sus plaquetas diferenciadas y en cuatro líneas celulares megacariocíticas (Meg-01, Dami, CHRF-288-11 y M-07e), sugiriendo que la expresión de estas citocinas en las plaquetas se puede originar a partir de su precursor. Además, el nivel de la expresión relativa del mRNA de las citocinas seguía el siguiente patrón: plaquetas > megacariocitos > Meg-01 > Dami > CHRF-288-11 > M-07e, lo cual lleva a pensar que el nivel de expresión de las citocinas está fuertemente relacionado con el estado de maduración de las células (6).

1.2. Proteínas plaquetarias.

Muchas de las funciones de las plaquetas se deben a su capacidad para almacenar un gran número de moléculas biológicamente activas en gránulos intracelulares. Estas moléculas pueden ser liberadas a la circulación o ser traslocadas a la superficie de las plaquetas durante su activación, proceso que genera un incremento en la demanda de energía y es regulado por reacciones de glicólisis y fosforilación oxidativa, así como la oxidación de ácidos grasos y en menor grado de la glutaminólisis (7). Existen tres tipos de gránulos en las plaquetas: los gránulos α , los gránulos densos y los gránulos lisosomales. Los gránulos α son los más abundantes (40 a 80 por plaqueta), y ellos derivan su contenido de proteína por una combinación de endocitosis y de biosíntesis. La lista de proteínas en los gránulos α es extensa e incluye factores de la coagulación, quimiocinas, proteínas de adhesión, factores mitogénicos y reguladores de la angiogénesis (8) (Figura 2).

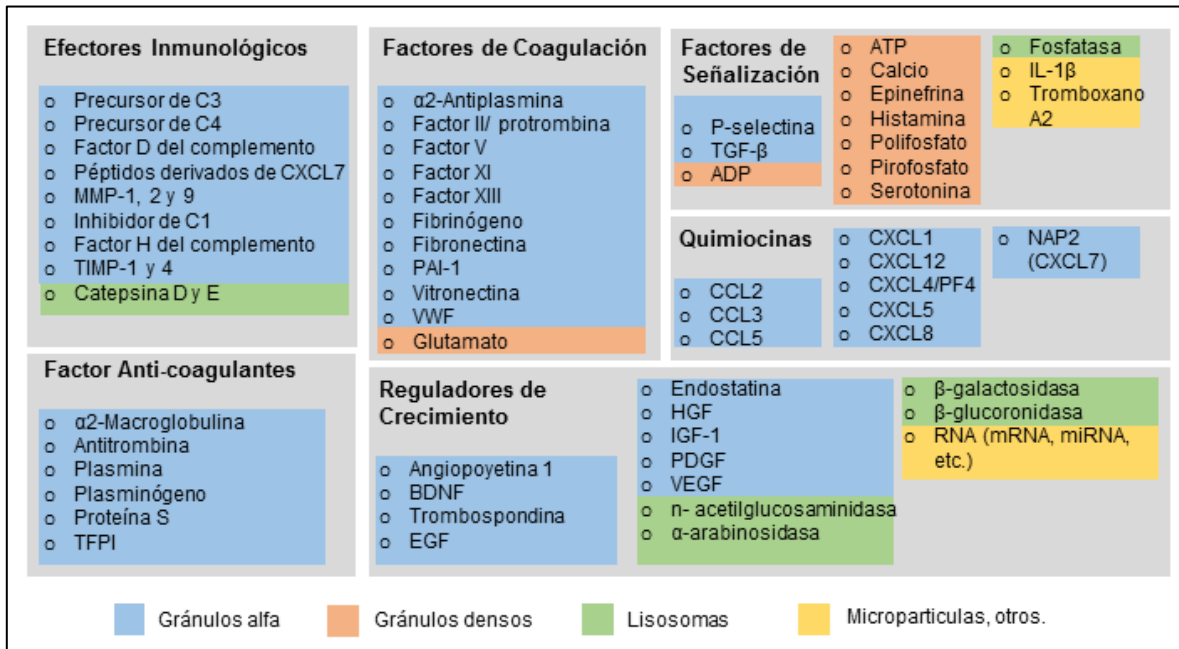


Figura 2. Factores que contienen las plaquetas y su localización. Lista de mediadores bioactivos que son liberados por las plaquetas humanas, categorizados de acuerdo a su función principal. Modificado de Li JL, *et al.* 2017 (9).

Los gránulos de las plaquetas contienen varias quimiocinas y citocinas pro- y anti-inflamatorias que no tienen un papel claro en la hemostasia. Un ejemplo serían las altas concentraciones del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en plaquetas normales (10), por lo cual las plaquetas circulantes parecen ser importantes para regular los niveles de TGF- β . Los pacientes con trombocitopenia inmune tienen niveles bajos de TGF- β en circulación, pero la terapia para restaurar los niveles totales de plaquetas también normaliza los niveles de TGF- β (11). Es interesante mencionar que en algunos trabajos se muestra que los pacientes con trombocitopenia inmune tienen deficiencias en las células T reguladoras (T_{reg}) CD4+CD25+FOXP3+ en sangre periférica, y se ha demostrado que las terapias que incrementan los números de plaquetas, como son la inyección intravenosa de inmunoglobulinas, dexametasona y eritropoyetina, restauran los números y funciones de las células T_{reg} en estos individuos (12, 13), esto podría deberse a que al restaurar los número de plaquetas, también se normalizan los niveles TGF- β en sangre y se ha sugerido que esta citocina participa en la inducción de la expresión de Foxp3 y de esta manera en el mantenimiento de las T_{reg} y en la inducción de las mismas a partir de células vírgenes (14).

Como se mencionó anteriormente, la membrana plaquetaria permite la interiorización de pequeñas biomoléculas, un ejemplo es el caso de las moléculas de MHC de clase I solubles que se encuentran en plasma y que su absorción por parte de las plaquetas podría tener implicaciones clínicas importantes al momento de realizarse una transfusión sanguínea, ya que estas moléculas solubles transfundidas pueden ser interiorizadas y posteriormente presentadas en la membrana plaquetaria (15,7), sin embargo, las consecuencias de esta transfusión son desconocidas. Además, se conoce que la endocitosis es un proceso importante para el ingreso de algunas proteínas hacia los gránulos α , como el fibrinógeno y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros (16); este proceso es selectivo, ya que se ha demostrado que las plaquetas no interiorizan todas las proteínas en plasma, a pesar de que se encuentren en altas concentraciones, tal es el caso de la albumina (17). Por lo cual, aún existe el debate sobre el origen de las proteínas que se encuentran almacenadas en las plaquetas.

Las plaquetas no sólo son almacenes de moléculas bioactivas, también tienen la capacidad para sintetizar moléculas. Evidencias recientes sugieren que las plaquetas contienen una cantidad substancial de mRNAs, los cuales son empaquetados durante la formación de las plaquetas a partir de los megacariocitos. Además, las plaquetas contienen toda la maquinaria traduccional para generar sus proteínas durante los eventos hemostáticos e inflamatorios (18,19). La producción reciente de proteínas por las plaquetas puede indicar que estas células tienen otras funciones en la defensa del hospedero poco conocidas. Con los nuevos conocimientos sobre el análisis de proteómica de las plaquetas algunas de estas funciones comienzan a ser caracterizadas. Por ejemplo, los análisis proteómicos han demostrado que tienen la capacidad de incrementar la expresión de más de 300 proteínas diferentes después de la activación con trombina como son: interleucina 1 (IL-1), receptores Tipo Toll (TLRs), CD154 (también conocido como CD40L), entre otras (20). Dentro de los mediadores de la respuesta inmunológica que se ha demostrado que las plaquetas son capaces de sintetizar a partir de mRNA se encuentran: histamina, serotonina, tromboxano A₂, Factor activador de plaquetas (PAF), Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), CXCL7, CXCL4, CXCL1, CXCL5, CCL5, CCL3, CCL7, IL-1 β , trombocidinas 1 y 2, y el ligando de TREM1 (7).

1.3. Transcriptoma de las plaquetas.

Como se ha mencionado anteriormente, las plaquetas contienen RNA citoplasmático y tienen la capacidad para realizar la síntesis proteica. Con la finalidad de conocer de forma global los transcritos presentes en las plaquetas se han utilizado microarreglos de expresión, y a partir de ellos se reportaron 2147 transcritos expresados en las plaquetas de individuos clínicamente sanos, 22% involucrados en el metabolismo y señalización de receptores y un 32% con una función desconocida. Por su parte el análisis en serie de expresión genética (SAGE) demostró que el 89% de los transcritos son mitocondriales. La retrotranscripción cuantitativa (qRT-PCR) confirmó la alta frecuencia de estos transcritos mitocondriales, siendo neurogranina (NGN), un substrato de la proteína C, y clusterina los más abundantes. La expresión de las proteínas derivadas de estos transcritos fue confirmada por medio de inmunoblots y citometría de flujo (21). Esto sugiere una relación entre la abundancia de los transcritos y la expresión de las proteínas derivadas de ellos. Otro estudio dónde incluyen el análisis de RNA no codificante, reveló la presencia de aproximadamente 9,500 mensajeros que dan origen a proteínas conocidas en las plaquetas, pero también se identificaron diversas clases de RNAs no codificantes, incluyendo: transcritos anti sentido, miRNAs, retro transposones y cientos de nuevos transcritos cortos y largos (22).

La caracterización de los mRNAs de las plaquetas aporta una valiosa información respecto a su función en la salud y enfermedad. Un ejemplo es el incremento de la proteína mieloides relacionada 14 (MRP-14) en plaquetas aisladas de pacientes con infarto al miocardio con elevación del segmento ST. También, a través de microarreglos de expresión en plaquetas ha sido posible identificar un pequeño grupo de transcritos con fuerte correlación con la incidencia de individuos con trombocitopenia esencial negativa para JAK2 con un 85% de precisión (23). Otros estudios reportan que las plaquetas expresan diferencialmente transcritos en pacientes con enfermedad cardiovascular (24), anemia de células falciformes (25) y lupus eritematoso sistémico (26). Así mismo, se ha determinado que la expresión de algunos de estos transcritos no sólo se correlaciona con el entorno del individuo, herencia o enfermedades, sino que el índice de masa corporal (BMI) del individuo también correlaciona con la expresión de los transcritos asociados a la ruta NFκB, como son *ICAM1*, *IFN-γ*, *IL-1 R1*, *IL-6*, *MPO*, *COX2*, *TNF*, *TLR2* y *TLR4* (27). En un estudio posterior se demostró que los transcritos relacionados a *IL-1 R1* e *IL-1β* aumentan su expresión en personas con obesidad, los cuales inducen la activación tanto del megacariocito como de las plaquetas promoviendo un ambiente protrombótico durante

la infección y obesidad; potencialmente contribuyendo al desarrollo de la enfermedad arterotrombótica (28).

Recientemente, dentro de los análisis de mRNAs, se demostró, haciendo uso de la qRT-PCR, que las plaquetas de individuos que presentan un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, debido al incremento en su BMI y a su perfil de lípidos, presentan una mayor cantidad de los transcritos de todos los TLRs (TLR1-TLR10), con un incremento significativo en los pacientes femeninos en comparación con los masculinos (29).

1.4. Las plaquetas y la inmunidad innata.

En trabajos recientes se ha demostrado que, además de realizar sus funciones hemostáticas tradicionales, las plaquetas son células efectoras versátiles con un amplio repertorio funcional dentro del sistema inmunológico, por lo que estas células podrían ser el puente entre la hemostasia y la respuesta inmunológica, contribuyendo en diferentes procesos: inflamatorios sistémicos, procesos inmunes y enfermedades (30) (Figura 3).

Las plaquetas tienen el potencial para funcionar como sensores de la inmunidad innata debido a que presentan en su superficie receptores para el reconocimiento de patrones (PRRs) funcionales, tales como TLRs, también presentan receptores de complemento (CRs) y receptores para el fragmento cristalizante (FcRs) para inmunoglobulinas. Inclusive, su expresión puede incrementarse posterior a la activación plaquetaria (32). Esta función puede desencadenar el proceso inflamatorio, en el cual las plaquetas liberarán diversos elementos para la reparación de daño endotelial tales como factores de coagulación, citocinas, modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento y factores angiogénicos (33). Sin embargo, en algunos casos las plaquetas pueden sobrepasar su función fisiológica y participar en la generación de inflamación patológica, facilitando el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (34), sepsis (35), artritis (36), entre otras. Las plaquetas, cuando son transfundidas a pacientes con trombocitopenia como componentes plaquetarios, incrementan sus funciones fisiológicas y de reparación de daño endotelial, pero en el 2-3% de los casos (37), la barrera fisiológica es sobrepasada y estas células liberan de sus gránulos α y gránulos densos cantidades significativas de factores pro-inflamatorios y directamente inflamatorios, así como moléculas solubles de unión a la membrana. Inclusive, en algunas ocasiones, las

plaquetas también pueden liberar de sus gránulos densos factores que inducen procesos alérgicos (38).

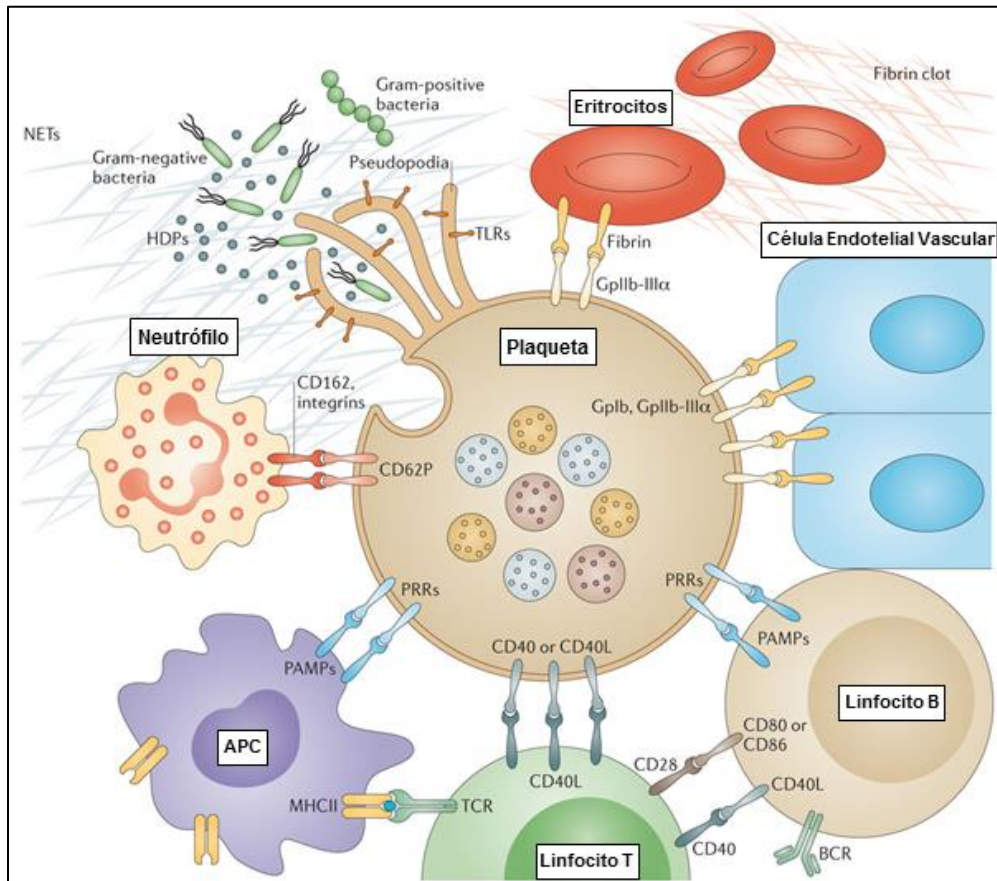


Figura 3. Participación de las plaquetas en la respuesta inmunológica. Las plaquetas están equipadas con un amplio repertorio de sensores para detectar señales de daño en el hospedero y patógenos. La activación plaquetaria a través de diversos estímulos inducirá la generación de pseudópodos extendidos, incrementando su área superficial y, por ende, incrementando su interacción con patógenos o sitios de daño. Entonces, las plaquetas activadas atrapan patógenos y liberan péptidos para la defensa del hospedero (HDPs), estos péptidos tienen una acción rápida y un efecto antimicrobiano potente sobre virus, bacterias, hongos y protozoarios. También son liberadas quimiocinas, como CXCL4 y CXCL8, para el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Además, las plaquetas son capaces de inducir la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), las cuales capturarán a los patógenos en matrices de DNA. En la inmunidad adaptativa, las plaquetas facilitan el procesamiento de patógenos y una efectiva señalización para la presentación de éstos de una célula presentadora de antígenos (APC) a una célula T, mediante señales de coestimulación vía CD40-CD40L. Paralelo a esto, las plaquetas, al detectar estímulos derivados del daño en el endotelio, inducirán la formación de coágulos de fibrina, por lo que las plaquetas podrían ser el nexo entre la respuesta inmune y la hemostasia. Modificado de Yeaman MR 2014 (31).

Posterior a su activación, las plaquetas translocan a la selectina P (CD62P) de los gránulos α a la membrana. Esta selectina le permite a la plaqueta el reclutamiento e inmovilización de neutrófilos y monocitos en un sitio de daño endotelial (39). También se

ha observado el reclutamiento de eosinófilos a pulmón vía P-selectina en casos de asma severa (40). Posteriormente, se establece una unión más estable mediante la interacción de la proteína leucocitaria Mac-1 y el receptor plaquetario GPIIb/IIIa, JAM3 e ICAM-2; promoviendo la formación de un trombo estable (41). El reclutamiento y estabilización de un complejo con otras poblaciones celulares de la respuesta inmunológica, como neutrófilos y monocitos, inducirá un incremento de la fagocitosis y, por lo tanto, una resolución de la infección más rápida y efectiva. Además, la unión plaqueta-neutrófilo va a potencializar el estallido respiratorio y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos en respuesta a infecciones con bacterias Gram positivas y negativas (42)

Otro mediador importante de la respuesta inmunológica liberado por la plaqueta es el ligando de CD40 (CD40L), su receptor, CD40, se encuentra en células endoteliales, monocitos, linfocitos y células dendríticas (DCs) (43). En monocitos, la unión al CD40L plaquetario estimula expresión de factor tisular, el cual activará la cascada de la coagulación (44). En las células endoteliales, CD40L plaquetario incrementa la expresión de los receptores de adhesión: E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1; así como la secreción de citocinas proinflamatorias como son: IL-6, IL-8 y MCP-1 (45). Además de los mediadores de unión a la membrana, las plaquetas secretan un amplio rango de citocinas. Se ha demostrado que, posterior a su activación, las plaquetas sintetizan y secretan IL-1 β , la cual incrementará tanto la expresión de receptores de adhesión, así como la secreción de IL-6 e IL-8 en células endoteliales, e incrementa la permeabilidad vascular mediada por el óxido nítrico (NO) (46, 47).

Las plaquetas también tienen la capacidad de liberar la quimiocina RANTES (CCL5), la cual es usualmente liberada por las células T citotóxicas. Se ha observado que RANTES liberada por las plaquetas se une a las células endoteliales promoviendo la adhesión de monocitos al endotelio inflamado y a las placas ateroscleróticas (48, 49).

Interesantemente, RANTES plaquetaria es capaz de formar heterómeros con la defensina alfa 1 de neutrófilos y el factor plaquetario 4 (PF4), estos heterómeros incrementan el reclutamiento de monocitos (50, 51).

Estas propiedades, conjuntamente, les permiten a las plaquetas hacerle frente a patógenos infecciosos, con diferentes resultados dependiendo de la naturaleza del invasor, debido a que el arsenal plaquetario comprende desde incrementar de la

respuesta inmune innata, mediante la activación de diferentes células hasta inducir directamente la muerte bacteriana.

1.5. Proteínas con actividad antimicrobiana en plaquetas.

Cuando las bacterias entran en el sistema circulatorio, las plaquetas son de las primeras células que ellas encuentran (52). Es bien conocido que las bacterias inducen la activación plaquetaria directa e indirectamente (53), pero evidencias recientes indican que las plaquetas también pueden alterar la actividad bacteriana por medio de la liberación de proteínas microbicidas (Tabla 1). En conjunto, se les conoce como proteínas plaquetarias microbicidas (PMPs), e incluyen quimiocinas, fibrinopéptidos y timosina β -4 (54). Las plaquetas transportan las PMPs a los sitios de infección donde llevan a cabo efectos antimicrobianos directos y potencializan las propiedades antimicrobianas de los leucocitos (55, 56, 57, 58). En estos estudios se ha demostrado que las plaquetas de conejos contienen, dentro del grupo de las PMPs, proteínas catiónicas con actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* (57), inclusive se ha demostrado la presencia de proteínas microbicidas plaquetarias inducidas por trombina (tPMP-1), las cuales tienen el potencial de lisar *S. aureus* (59). Más adelante, otro grupo de proteínas antibacterianas fue identificado, las trombocidinas (TC), en las que se incluyeron TC-1 y TC-2, las cuales eran capaces de erradicar *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Lactococcus lactis* (60). Uno de los puntos interesantes de este trabajo fue que se demostró que TC-2 no lisaba la membrana celular bacteriana, indicando que el mecanismo de acción de TC-2 es diferente al de TC-1 y hasta el momento es desconocido.

Las quinocidinas plaquetarias (PK), quimiocinas con efectos microbicidas, son otro grupo de proteínas microbicidas plaquetarias. A pesar de que estas proteínas fueron descritas por primera vez en plaquetas, ahora es bien sabido que la identidad de estas proteínas es la misma que las quimiocinas liberadas por otras estirpes celulares. Por ejemplo, la proteína básica plaquetaria (PBP) es mejor conocida como CXCL7 en los monocitos y se han demostrado sus efectos antimicrobianos directos hacia bacterias Gram negativas (62). Una de las PKs más importantes es el Factor plaquetario 4 (PF4), también conocido como CXCL4. Numerosos estudios han demostrado que los niveles de PF4 en suero se incrementan dramáticamente durante un proceso infeccioso, y estos se correlacionan con

un incremento de los niveles de CD62P soluble en suero, sugiriendo que PF4 fue liberado, en parte, por la desgranulación de las plaquetas (63, 64).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas microbicidas que contienen las plaquetas

Familia	Proteínas	
Proteínas Microbicidas Plaquetarias (PMP)	RANTES (CCL5)	Fibrinopéptido A
	Timosina β -4	Fibrinopéptido B
Proteínas Microbicidas Plaquetarias derivadas del estímulo con Trombina (t-PMP)	Trombocidina (TC-1)	
	Trombocidina 2 TC-2)	
Quinocidinas Plaquetarias (PK)	Factor Plaquetario 4 (PF4) (CXCL4)	Proteína Básica Plaquetaria (PBP) (CXCL7)
	IL-8 (CXCL8)	Péptido Activador de Neutrófilos (NAP-2)
	Proteína Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1) (CCL2)	Monocina Inducida por Gamma (MIG) (CXCL9)
	Linfotactina (CL1)	Proteína Inducida por Interferon Gamma 10 (IP-10) (CXCL10)
Péptidos Antimicrobianos (AMP)	Defensina Beta 1 (hBD-1)	

Adaptado de Yeaman 2010 (61)

Recientes hallazgos muestran que las PMPs no abarcan en su totalidad el repertorio de proteínas con actividad antimicrobiana que contienen las plaquetas. Un grupo muy importante de este tipo de proteínas es el de los péptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales son péptidos con un tamaño de 10 a 150 aminoácidos, con alrededor de un 60% de aminoácidos con carga positiva, estos son almacenados en las células como propéptidos o péptidos maduros y una vez secretados son capaces, no sólo de lisar bacterias, sino también de inducir apoptosis en células blanco, regenerar tejidos y modular la respuesta inmune. En humanos se han descrito 3 principales grupos de AMPs: 1) Defensinas α y β ; α -1 a 4 en neutrófilos, α -5 a 6 en las células de Panneth en el intestino delgado, β -1 de manera constitutiva a nivel del tracto génito urinario y respiratorio y β -2 en la mayoría del epitelio interno y en la piel. 2) Catelicidinas, sólo se conoce la LL-

37 aislada de células mieloides y epiteliales. 3) Granulicina, producida por linfocitos T citotóxicos y NK (66).

Hasta el momento, en las plaquetas sólo se ha caracterizado la presencia del mRNA y la proteína para Defensina beta 1 (hBD-1), expresada principalmente en células epiteliales, la cual se encuentra de manera extragranular como un componente citoplasmático de las plaquetas. hBD-1 es liberada en mayores concentraciones cuando las plaquetas son estimuladas con α -toxina, un producto de *S. aureus* capaz de permeabilizar las células blanco, a su vez, esta defensina es capaz inhibir el crecimiento de *S. aureus* y al mismo tiempo estimular a las células polimorfonucleares (PMN) para que formen NETs capaces de capturar y matar a las bacterias (67). En cuanto a las defensinas de la familia alfa, en un estudio proteómico de plaquetas de individuos clínicamente sanos se registró la presencia de Defensina alfa 1, sin embargo, su expresión no fue completamente caracterizada, ya que los autores no confirman la presencia del mRNA de la defensina e inclusive, consideran la idea de que algunas proteínas no antes descritas en plaquetas que hallaron en su ensayo proteómico pudieron haber sido liberadas por otros linajes celulares e interiorizadas por las plaquetas (68).

1.6. Antecedentes directos.

A pesar de que las plaquetas cuentan con bajas concentraciones de RNA, en el proyecto que antecede al presente, se logró realizar un microarreglo de expresión génica mediante un pool de RNAs de 8 pacientes con sepsis y sintomatología similar. Dentro de los mRNAs asociados a la respuesta inmunológica que están sobreexpresados encontramos a AZU1, IL-11, IL-17A, IL-21, LTF, MPO, PGLYRP1, PTGES, SLPI, CCL2, CAMP, DEFA4, DEFA1, BPI, entre otros; así como una disminución de la expresión de FCER2, TRAF2, IFNA8, NOX1 y IL23R en las plaquetas de pacientes con sepsis con respecto a un control basal. En la Tabla 2 se muestran los genes sobreexpresados en las plaquetas de individuos con sepsis que codifican para proteínas con función antimicrobiana (69).

Cabe destacar que la presencia del gen de DEFA1 en las plaquetas fue de suma importancia, ya que las defensinas α (DEFA 1-3) se encuentran predominantemente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y son producidos por sus precursores en médula ósea (70), también se han identificado en células NK, células $T_{\gamma\delta}$, células B y monocitos

(71). Estas defensinas son péptidos catiónicos, relativamente ricos en arginina, con un peso molecular bajo de 3 a 4.5 kDa. Las secuencias de estas defensinas son casi idénticas: XC₁YC₂RIPAC₃IAGERRYGTC₄IYQGRLWAF₅C₆, dónde “X” es alanina en DEFA1, ausente de DEFA2 y ácido aspártico en DEFA3, además, contienen tres puentes disulfuro en las posiciones: 1-6, 2-4 y 3-5 (70).

Tabla 2. Genes asociados a proteínas microbicidas sobreexpresados en plaquetas activadas

Gen	Proteína	Cambio de Expresión	Gen	Proteína	Cambio de Expresión
<i>AZU1</i>	Azurocidina	207.3	<i>FGB</i>	Fibrinopeptido B	3.09
<i>DEFA1</i>	Defensina alfa 1	88.15	<i>CXCL4</i>	PF-4 (CXCL4)	1.98
<i>CAMP</i>	Catelicidina	76.01	<i>HAMP</i>	Hepcidina	1.88
<i>CXCL8</i>	IL-8 (CXCL8)	55.92	<i>PBP</i>	PBP (CXCL7)	1.87
<i>BPI</i>	BPI	48.27	<i>CCL5</i>	RANTES (CCL5)	1.7
<i>FGA</i>	Fibrinopeptido A	14.78	<i>TMSB4</i>	Timosina β-4	1.45
<i>HTN3</i>	Histatina 3	13.17	<i>CCL20</i>	MIP-3α (CCL20)	1.34
<i>CXCL1</i>	GRO-α (CXCL1)	12.43	<i>CXCL11</i>	I-TAC (CXCL11)	1.07
<i>CCL2</i>	MCP-1 (CCL2)	9.55			

IL-8: Interleucina 8; BPI: Proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana; GRO-α: oncogen regulador de crecimiento alfa; MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1; PF-4: Factor plaquetario 4; PBP: Proteína básica plaquetaria; MIP-3α: Proteína inflamatoria de macrófagos alfa 3; I-TAC: Quimioatrayente alfa de células T inducido por interferón. Adaptado de Valle-Jiménez X *et al.* 2019 (69).

Los genes que codifican las defensinas alfa están localizados en el cromosoma 8p23, sin embargo, hasta el momento el gen que codifica para DEFA2 no ha sido identificado, lo que indica que DEFA2 podría ser un producto proteolítico de DEFA1 y DEFA3 debido a su gran homología con respecto a la secuencia de aminoácidos. Las defensinas alfa son producidas de manera constitutiva como propéptidos y su maduración a su forma biológicamente activa requiere de un proceso proteolítico para remover el pro-dominio N-terminal, reduciendo el propéptido inicial de 75 aminoácidos a 56 aminoácidos (73).

La principal función que se les adjudica a las defensinas alfa en la respuesta inmune es la ruptura de las membranas bacterianas. A través de ensayos *in vitro* donde utilizan la bacteria *E. coli* ML-35p, cepa reportera que permite monitorear la integridad de sus membranas en tiempo real, se observó que la defensina era capaz de permeabilizar la

membrana exterior y posteriormente la interior, induciendo la suspensión abrupta de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, así como la pérdida del potencial formador de colonias (74); este proceso se puede llevar a cabo de manera intracelular dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas o de manera extracelular cuando la defensina es secretada al medio.

Conjuntamente, las defensinas también tienen un efecto quimiotáctico en células mononucleares y neutrófilos, e inducen la migración de células T al sitio de infección (75). Inclusive, se ha demostrado que estas células mononucleares también presentan y secretan defensinas alfa, las cuales, además, tienen la capacidad de inhibir la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) en macrófagos. Esta inhibición se debe a que las defensinas alfa 1-3 inducen un incremento en la producción de MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, quimiocinas que competirán contra el virus por el receptor CCR5 en los macrófagos (76). DEFA1 también ha mostrado una actividad neutralizante contra el virus del herpes simple de tipo I (HSV-1) y de tipo II (HSV-2), virus de la estomatitis vesicular, virus de la influenza A (IAV) y, en altas concentraciones, contra citomegalovirus (77). Sin embargo, esta función neutralizante de la actividad viral por parte de las defensinas alfa desaparece cuando sus uniones disulfuro se reducen debido a un incremento de las concentraciones de albúmina (72), por lo cual, se requiere una concentración local muy alta de la defensina para que sobrepasen los efectos inhibidores de cualquier componente presente en el suero en el sitio de la infección o dentro del fagolisosoma. Para poder incrementar sus concentraciones de defensina intracelular, las células pueden adquirir defensinas exógenas de diferentes maneras, incluyendo la fagocitosis de gránulos azurófilos (78) y la pinocitosis no selectiva de proteínas catiónicas encontradas en el suero, como en el caso de BPI y lactoferrina (79).

Como se mencionó anteriormente, las defensinas α no se han descrito completamente en plaquetas ni en megacariocitos, por lo cual surgen nuevas dudas acerca de si proviene de la línea megacariocítica, su potencial de traducción a proteína y su posterior secreción al medio.

2. Justificación

Las plaquetas humanas son células capaces de producir y liberar diferentes proteínas con actividad microbicida, hasta la fecha no ha sido caracterizada la expresión de defensina alfa 1 en ellas. El presente trabajo pretende identificar este péptido en plaquetas y megacariocitos, célula precursora donde hasta el momento no se han identificado péptidos antimicrobianos. También se requiere conocer su localización, capacidad de secreción y potencial microbicida. Los resultados de este proyecto son relevantes ya que podrían reafirmar que tanto las plaquetas como los megacariocitos participan en la respuesta inmunológica, además, permitirían confirmar funciones en la respuesta contra bacterias que no han sido caracterizadas previamente en este linaje celular.

3. Planteamiento del problema

Las plaquetas son células que participan en la respuesta inmune hacia infecciones bacterianas gracias a su capacidad para reconocer diferentes componentes microbianos y a la capacidad de liberar proteínas antimicrobianas, como son: las proteínas microbicidas plaquetarias, trombocidinas, quinocidinas y defensina beta 1. Con base en los resultados que arrojó un microarreglo de expresión génica de plaquetas de individuos con sepsis se observó que las plaquetas también podrían contener otras proteínas con acción microbicida, que no han sido caracterizadas previamente en este linaje celular. Dentro de ellas se identificó el transcrito de defensina alfa 1, el cual se incrementa en un proceso infeccioso-inflamatorio. Sin embargo, la expresión de esta defensina no ha sido caracterizada completamente en las plaquetas, y en los megacariocitos se desconoce la presencia de algún péptido antimicrobiano. Considerando lo anterior, nos preguntamos: ¿Los megacariocitos y las plaquetas humanas pueden almacenar y secretar defensina alfa 1 funcionalmente activa?

4. Hipótesis

Los megacariocitos y las plaquetas humanas tendrán la capacidad de expresar, almacenar y secretar defensina alfa 1 en su forma biológicamente activa.

5. Objetivos

Objetivo general

Identificar y caracterizar la expresión de Defensina alfa 1 en megacariocitos y su transferencia a las plaquetas diferenciadas, así como su localización y función biológica.

Objetivos específicos

1. Identificar el mRNA de DEFA1 en plaquetas de sangre periférica y en las células Meg-01.
2. Localizar la proteína de DEFA1 en plaquetas de sangre periférica y en las células Meg-01.
3. Estandarizar la diferenciación de la línea Meg-01 a partículas tipo plaqueta con Trombopoyetina.
4. Evaluar la transferencia del mRNA y proteína a partir de las células Meg-01 a las plaquetas en ensayos de diferenciación *in vitro*.
5. Evaluar si las plaquetas, células Meg-01 y sus partículas diferenciadas son capaces de secretar DEFA1 al medio a partir de la estimulación con diversos agonistas.
6. Determinar si las plaquetas pueden interiorizar la defensina usando el modelo de partículas tipo plaqueta.
7. Analizar si la DEFA1 plaquetaria posee actividad antimicrobiana.

6. Materiales y métodos

6.1. Material biológico.

Línea celular de megacarioblastos humanos Meg-01 (ATCC® CRL-2021™; Manassas, VA, USA). Las células se mantuvieron viables y proliferando en suspensión con medio RPMI 1640 (ATCC) suplementado con L-glutamina (SIGMA-ALDRICH; St. Lois, MO, USA), 10% de suero fetal bovino (SFB; SIGMA-ALDRICH), inactivado por calor, y un 1% de antibiótico (estreptomomicina-penicilina; Biowest, Nuaille, FR) a 37°C y 5% de CO₂. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 750 g por 5 minutos.

Cepa de *Escherichia coli* 11229™ (ATCC). La bacteria en un inicio se proliferó en caldo nutritivo (DIBICO; Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, MEX) y posteriormente fue crecida en placas de agar nutritivo (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA), para tomar una colonia y crecerla en caldo nutritivo a 37°C hasta llegar a su fase logarítmica del crecimiento (aproximadamente 18 horas), este cultivo se lavó 3 veces con solución salina fosfatos (PBS) y se resuspendió en medio RPMI 1640 (GIBCO, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA) con 30% de SFB (GIBCO), se prepararon alícuotas de 1 mL, las cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias/ mL sembrando una serie de diluciones en placas de agar nutritivo (2.8×10^8 UFC/mL).

6.2. Obtención de plaquetas de sangre periférica.

Se recolectaron 8mL de sangre de individuos clínicamente sanos, bajo la aprobación del comité de ética (Anexo I) y bajo su consentimiento (Anexo II). Se centrifugaron por 15 minutos a 150 g para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se lavó con un regulador de citratos (CGS-EDTA; citrato de sodio 1.29 mM, ácido cítrico 3.12 mM, Etilendiaminotetraacético 4.99 mM pH=6.5) en una relación 1:1 (v/v) y se centrifugó por 15 minutos a 150 g. Por último, se recolectó el paquete plaquetario precipitado y se resuspendió en 3mL de regulador CGS (citrato de sodio 3.87 mM, cloruro de sodio 39.96 mM y dextrosa anhidra 9.99 mM pH= 6.5) para posteriormente centrifugar por 12 minutos a 150 g y recolectar el precipitado.

6.3. Obtención de partículas tipo plaqueta a partir de células Meg-01.

Las partículas tipo plaqueta (PLP) se obtuvieron de cultivos de Meg-01 tratados con 100 ng/mL de Trombopoyetina Humana Recombinante (TPO; Abcam; Cambridge, UK) por 48 horas a 37°C. Los cultivos se centrifugaron a 150 g por 15 minutos, se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 750 g por 15 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 1600 g por 15 minutos y se recolectó el precipitado, el cual contiene las PLPs.

6.4. Tinción de Wright.

Se realizaron frotis a partir de plaquetas recién purificadas o de células MEG-01 resuspendidas en PBS. Las laminillas se cubrieron con 3mL de colorante Wright (SIGMA-ALDRICH) y se dejaron reposar por 10 minutos. Posteriormente, se adicionó regulador de fosfatos hasta obtener una coloración verde metálica y se reposaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se lavaron con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio óptico.

6.5. Extracción de RNA total.

La extracción de RNA se realizó con el kit RNeasy Mini (QIAGEN; Hilden, DE). A los pellets de plaquetas, megacariocitos y PLPs se les agregó 500 µL de Regulador RLT para su desnaturalización y β-mercaptoetanol (10 µL por 1 mL de Regulador RLT) para eliminar la actividad de las RNAsas. Al lisado resultante se le agregó 200 µL de etanol al 70%. Posteriormente, se colocaron las muestras en una minicolumna y se centrifugaron durante 15 seg a 8000 g, se eliminó el fluido sobrante. En seguida, se colocaron 350 µL de Regulador RW1, se centrifugó nuevamente durante 15 seg a 8000 g y se desechó el líquido sobrante. A la minicolumna se añadieron 500 µL de Regulador RPE, se centrifugó durante 15 seg a 8000 g y se eliminó el líquido sobrante. Se añadieron nuevamente 500 µL de Regulador RPE a la minicolumna y se centrifugó durante 2 min a 8000 g y se retiró cuidadosamente la minicolumna RNeasy del tubo de recolección para colocarla un tubo eppendorf de 1.5 mL. Finalmente, se añadieron 50 µL de agua libre de RNAsas directamente a la membrana de la minicolumna y se procedió a centrifugar durante 1 min a 8000g, para eluir el RNA.

Para eliminar la contaminación con DNA genómico, se utilizó el Kit DNA-free (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, por lo cual a nuestras muestras de RNA se les agregó 3 μL de regulador de DNAsa libre de RNAsas y 1 μL de enzima rDNAsa. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se le adicionaron 2 μL de Reagent Inhibitor y se incubaron 3 minutos en frío. A continuación, se centrifugaron durante 3 min a 1600 g y se recuperó el sobrenadante con el RNA libre de DNA. La concentración de RNA se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se ajustó a una concentración de 1000 ng/ μL para realizar la RT.

6.6. Determinación de Defensina Alfa 1 por medio de PCR en punto final y tiempo real.

Con el RNA purificado de plaquetas, células Meg-01 y PLPs se realizó la síntesis del cDNA mediante retro transcripción utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Se adicionó 1 μL de oligo (dT) la cantidad necesaria de RNA para obtener una concentración de 1000 ng/ μL en 12 μL de solución y se incubó en el termociclador (Axygen, Corning Inc., NY, USA) a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, se le adicionó 8 μL de la mezcla de reacción (4 μL regulador de reacción 5X, 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor, 1 μL de Revert Aid M-MuLV RT y 2 μL dNTP Mix) y se incubó a 42°C por 60 minutos y a 70°C por 5 minutos.

Para la amplificación del gen de Defensina alfa 1 (*defa1*) se realizaron reacciones de PCR en un volumen final de 15 μL utilizando el kit Maxima Hot Start PCR Mix 2X (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones de PCR se prepararon adicionando a cada tubo para PCR: 7.5 μL de Master Mix 2X, 0.6 μL de iniciadores en una concentración 10 μM y 1 μL del cDNA a evaluar, las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 3. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2% (p/ v) y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para reconocer el gen de DEFA1 (138pb) y corresponden a las siguientes secuencias:

5' CAGAAGTGGTTGTTCCCTTGC

3' GAGTCTTCCCTGGTAGATGC.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación los genes de β -actina y defensina alfa 1

Desnaturalización	5 minutos	95°C	1 ciclo
Hibridación	60 segundos	95°C	35 ciclos
	60 segundos	60°C	
	60 segundos	72°C	
Extensión	5 minutos	72°C	1 ciclo

Los resultados se normalizaron con el gen constitutivo β -Actina (180pb), cuyos iniciadores son:

5' GCGTTACACCCTTTCTTGAC

3' TTGTGAACTTTGGGGGATGC.

Para la cuantificación del gen mediante RT-PCR en tiempo real se utilizó la enzima Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), empleando 7.5 μ L del Mix (2X), 0.5 μ L de cada uno de los iniciadores del gen de interés y 2 μ L de cDNA. El equipo y software que se utilizó fue el step one plus Real time (Applied Biosystems; Foster City, California, USA).

6.7. Determinación de Defensina Alfa 1 mediante citometría de flujo.

Las plaquetas de sangre periférica, células Meg-01 y las PLPs fueron recolectadas, lavadas con PBS y tratadas con el kit de fijación/permeabilización Citofix/Cytoperm (BD Biosciences) para realizar una tinción intracelular indirecta con 5 μ L del anticuerpo primario murino anti-DEFA1 humana (clona: D1F4, Novus Biologicals; Littleton, Colorado, USA) y 1 μ L del anticuerpo secundario anti-ratón purificado de cabra y conjugado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA), entre cada adición de anticuerpo se realizó una incubación de 30 minutos a 4°C y dos lavados con PBS. Posteriormente, se realizó una tinción superficial agregando a las preparaciones 5 μ L de mAbs anti-CD41 humano conjugado con FITC (clona: MOPC-21; BD Biosciences), se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Finalmente, las preparaciones se lavaron 2 veces con PBS y las células fueron recolectadas nuevamente en este regulador de fosfatos. Como control de isotipo, se utilizaron los anticuerpos: DEFA1; murino IgG1, κ monoclonal (clona: B11/6; BD Biosciences), CD41 FITC murino IgG3, κ monoclonal (clona: J606; BD

Biosciences). Las células se analizaron en el citómetro de flujo MACSQuant (Milteny Biotec; Bergisch Gladbach, DE) y los resultados obtenidos fueron analizados con el software FlowJO v10 (FlowJo, LLC; Ashland, Oregon, USA).

6.8. Localización de Defensina Alfa 1 mediante microscopía confocal.

Se realizaron frotis a partir de plaquetas recién purificadas de sangre periférica o de células Meg-01, respectivamente resuspendidas en PBS. Las preparaciones se fijaron y permeabilizaron mezclando e incubando a 4°C durante 30 minutos con solución Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences). Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS IX. Las laminillas fueron incubadas por 30 minutos a 4° con los anticuerpos: CD41 FITC mÚrido IgG3, κ monoclonal (clona: J606; BD Biosciences) y CD62P conjugado con BV421 (clona AK-4, BD Biosciences). Posteriormente, se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo de ratón monoclonal anti DEFA1 humana (clona: D1F4, Novus Biologicals) diluido 1:25. Se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante dos lavados con Perm/Wash. Se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar la tinción secundaria incubando las laminillas a 4°C durante 30 minutos con el anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor®647 (Jackson Immuno) diluido 1:50. Se eliminó el exceso de anticuerpo y se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con Perm/Wash. Los controles de isotipo que se utilizaron fueron los mismos de los ensayos de citometría de flujo (apartado anterior). Finalmente, las muestras fueron visualizadas en el microscopio confocal LSM 5 Pascal (Carl Zeiss; Oberkochen, DE) y las imágenes analizadas utilizando el software LSM Image Browser (Carl Zeiss).

6.9. Ensayos de liberación de Defensina Alfa 1

Las plaquetas, células Meg-01 y PLPs fueron recolectadas y se estimularon 1×10^6 células de cada población celular con trombina (Dade Behring Inc; Deerfield, Illinois, USA) (1 UI/mL), adenosin difosfato (ADP; SIGMA-ALDRICH) (1 µg/mL) y LPS (SIGMA-ALDRICH) (1 µg/mL), durante 30 minutos a 37°C. Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó DEFA1 secretado mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA). Además, se estimularon células Meg-01 con TPO (100 ng/mL) (Abcam) a 37°C durante 48 horas. Se recolectaron sobrenadantes a: 30 minutos, 6, 12, 24 y 48 horas. Se cuantificó la liberación de DEFA1

de mediante densidad óptica, la lectura se realizó a 450nm con el lector de microplacas Chromate 4300 (Awareness Technology Inc.; Palm City, FL, USA).

6.10. Ensayos de interiorización de Defensina Alfa 1

Se recolectó el plasma de los 6 donadores clínicamente sanos que participaron en los ensayos de citometría de flujo y se cuantificó en ellos la concentración de DEFA1 mediante ensayos de ELISA (R&D Systems). Posteriormente, se produjeron PLPs a las que se les agregó la cantidad necesaria de plasma para llegar a una concentración de 5ng de DEFA1 por 1×10^6 PLPs. La solución se llevó a un volumen final de 1mL con medio RPMI 1640 (ATCC) y las muestras fueron incubadas por 15, 30, 60 y 180 minutos, en cada punto de tiempo se recolectaron PLPs y sobrenadantes. Se realizó una tinción intracelular en las PLPs para evaluar la expresión de DEFA1 por citometría de flujo y la concentración de DEFA1 en los sobrenadantes se determinó mediante ensayos de ELISA (R&D Systems).

6.11. Determinación de la actividad antimicrobiana de Defensina Alfa 1 secretada por plaquetas

La actividad microbicida de la defensina alfa 1 liberada por plaquetas fue determinada contra *Escherichia coli* (11229™, ATCC). Para este ensayo, se obtuvieron plaquetas de cuatro donadores sanos, las cuales fueron estimuladas con trombina (Dade Behring) ($1 \text{ U/mL} \times 10^6$ células) en medio RPMI 1640 (ATCC) e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron recolectados y en ellos se cuantificó DEFA1 mediante ensayos de ELISA.

Posteriormente, se incubaron 1×10^5 UFC/mL de bacterias con medio RPMI 1640 (GIBCO) o ampicilina (500 µg/mL), o con los sobrenadantes de las plaquetas estimuladas con una concentración de 15 ng/mL de DEFA1, o con los mismos sobrenadantes, pero con la DEFA1 eliminada mediante panning. El proceso de panning se llevó a cabo incubando una placa de 96 pozos con 100 µL por pozo de anticuerpo monoclonal de ratón anti-DEFA1 humana (clona: 867919R; R&D Systems) durante 12 horas a temperatura ambiente, en seguida se lavó con Tween al 0.05% y se incubó con 1% de albúmina suero bovino en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, nuevamente se lavó la placa y en seguida se adicionaron los sueros en los que se requería el bloqueo de DEFA1, los cuales

se incubaron por dos horas a temperatura ambiente. Se recolectaron los sueros y se procedió a seguir con el experimento principal.

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 20 μ L de las bacterias bajo las diferentes condiciones descritas anteriormente durante dos horas, en intervalos de 30 minutos, y se sembraron en placas de agar nutritivo (BD Biosciences) por el método de dispersión con varilla acodada. Finalmente, las placas con medio se incubaron por 18 horas a 37°C y se determinó el número de UFC/mL por conteo en placa.

6.12. Pruebas Estadísticas

Los datos obtenidos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar del número indicado de experimentos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney en la comparación de los resultados de PCR en tiempo real entre las células Meg-01 y las plaquetas. Para el análisis de los resultados de citometría entre células Meg-01 y plaquetas se utilizó U de Mann-Whitney, para los ensayos entre PLPs y células Meg-01 con y sin tratamiento con TPO se utilizó la prueba Kruskal-Wallis. En los experimentos de interiorización de DEFA1 en las PLP se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías junto con la prueba de comparación múltiple de Dunn-Sidak. Además, los resultados de los ensayos de liberación de DEFA se analizaron mediante la prueba Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn-Sidak. Finalmente, en la determinación de la actividad antimicrobiana de DEFA1 secretada por plaquetas se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías con la comparación múltiple de Tukey. El tipo de prueba estadística se seleccionó tomando en cuenta el número de repeticiones y la distribución de los datos en cada experimento, para determinar una diferencia significativa se consideró el valor de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Las plaquetas de sangre periférica y las células Meg-01 contienen el RNA mensajero de Defensina Alfa 1.

A pesar del tamaño celular de las plaquetas (Figura 4A) con respecto a las células Meg-01 (Figura 4B) fue posible la correcta purificación del RNA y posteriormente, mediante RT-PCR determinó la presencia del mRNA de defensina alfa 1 en ambas poblaciones celulares (Figura 4C). Además, se llevó a cabo la amplificación por medio de PCR en tiempo real para cuantificar el cambio de expresión entre ambos tipos celulares. Observando una expresión 40 mil veces mayor del gen de DEFA1 en las plaquetas de sangre periférica con respecto a las células Meg-01 (Figura 4D). Con los resultados anteriores, se confirmó la presencia del gen de la DEFA1 en la línea megacariocítica, además de una expresión significativamente mayor en las plaquetas de individuos clínicamente sanos.

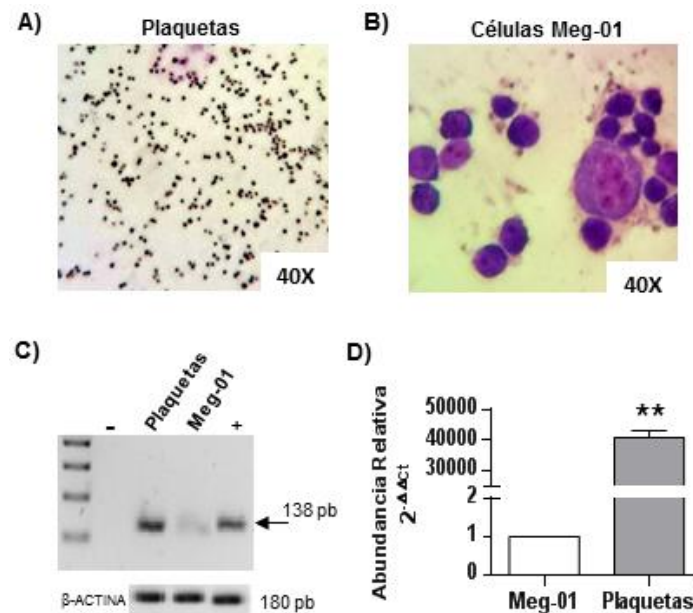


Figura 4. Expresión del mRNA de Defensina Alfa 1 en plaquetas y en células Meg-01. Tinción de Wright que muestra la morfología propia de la población de (A) plaquetas y (B) células Meg-01 por medio de microscopía óptica (40x). (C) Productos de PCR obtenidos por la amplificación de los iniciadores de DEFA1 (138pb) a partir de cDNA de plaquetas y células Meg-01, como control positivo se utilizó cDNA de leucocitos totales. (D) Productos obtenidos de PCR en tiempo real de tres muestras representativas, la gráfica de barras muestra la expresión relativa de DEFA1 (expresada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en plaquetas y células Meg-01, los resultados fueron normalizados con β -Actina. En cada caso se realizaron 6 repeticiones. Análisis por Mann-Whitney, ** $p < 0.01$.

7.2. Las plaquetas y las células Meg-01 contienen Defensina Alfa 1 a nivel de proteína.

El análisis de la expresión de DEFA1 a nivel de proteína se llevó a cabo mediante citometría de flujo, para ello se realizó una tinción de la superficie extracelular con un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD41 (integrina alfa-IIb/beta-3), sólo expresado por células de la línea megacariocítica, observando que el incremento de la expresión de CD41 en superficie está relacionado con un mayor estado de maduración. Para el análisis se seleccionaron sólo las células CD41+ (Figura 5A). A través de tinciones intracelulares se analizó la expresión de DEFA1 (Figura 5B). Los resultados demuestran la presencia de la proteína en ambos tipos celulares, siendo las células Meg-01 quienes presentan una mayor intensidad media de fluorescencia (MFI) (17.84 ± 2.45) y un mayor porcentaje de células positivas ($91.9\% \pm 3.53\%$), con respecto a las plaquetas de sangre periférica (5.23 ± 1.28 y $33\% \pm 8.53\%$, respectivamente) (Figura 5C). Esto nos indica que, a pesar de que las plaquetas tienen una mayor cantidad de RNA mensajero de DEFA1, a nivel de proteína tienen una expresión 3 veces menor con respecto a las células Meg-01.

7.3. Las plaquetas y células Meg-01 contienen Defensina Alfa 1 en sus gránulos alfa

Diversas proteínas con actividad microbicida que provienen de las plaquetas, se encuentran de manera intracelular en los gránulos alfa plaquetarios. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de defensina beta 1 de manera extragranular, como un componente citoplasmático de las plaquetas. Por lo cual, se buscó la localización de DEFA1 en las plaquetas y en las células Meg-01. Para ello, se realizaron tinciones intracelulares con los anticuerpos seleccionados para los ensayos de citometría de flujo y, adicionalmente, se agregó un anticuerpo anti-CD62P humano para identificar gránulos alfa, debido a que las P-selectinas se encuentran dentro de los gránulos alfa cuando las plaquetas se encuentran en un estado no activado. En la Figura 6, se muestran las imágenes de microscopía confocal, donde los gránulos alfa se observan en una coloración azul y de color rojo la defensina, al sobreponer las imágenes podemos observar que la defensina colocaliza con los gránulos α (coloración rosa), tanto en las plaquetas como en las células Meg-01. Sin embargo, en las células Meg-01 también se observa la defensina de manera extragranular, por lo cual, los megacariocitos también podrían contener DEFA1 en su citoplasma o en otro tipo de gránulos, diferentes a los gránulos alfa.

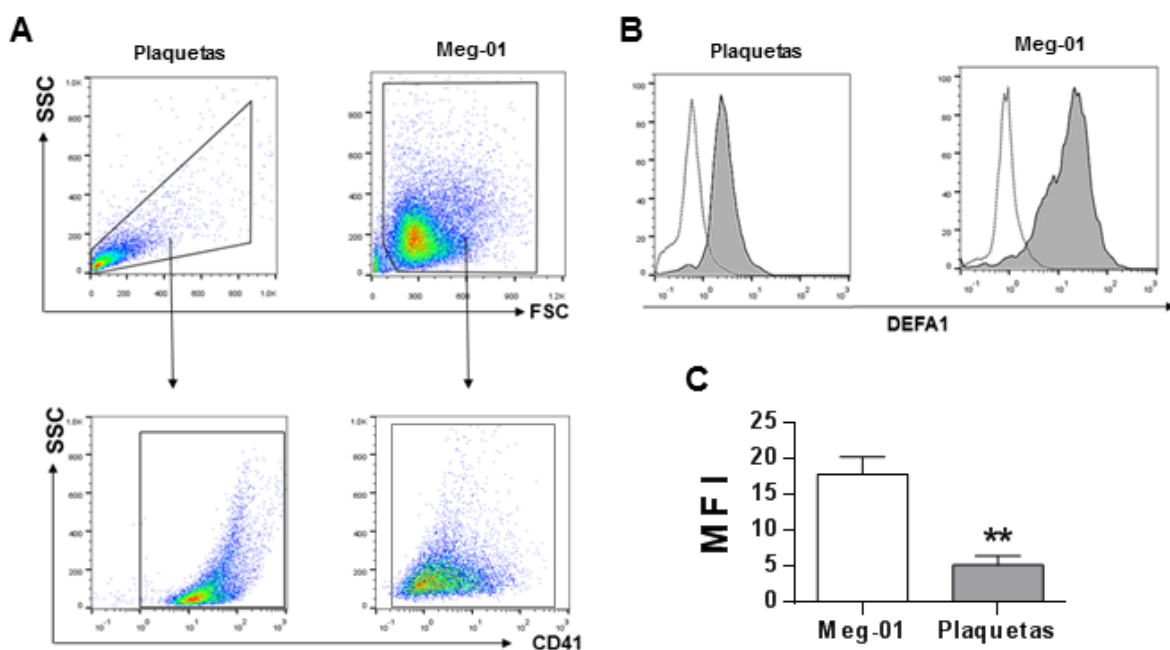


Figura 5. Determinación de la proteína de Defensina Alfa 1 en plaquetas y células Meg-01 por citometría de flujo. (A) Se purificaron plaquetas de sangre periférica de donadores clínicamente sanos y se recolectaron células Meg-01 de cultivos celulares, a partir de gráficos de eventos sencillos se seleccionaron las células que por su tamaño y complejidad correspondieran a plaquetas o células Meg-01, posteriormente, se seleccionaron las células CD41 para el análisis intracelular de la expresión de DEFA1 por citometría. (B) Histogramas de dos muestras representativas donde se observa la expresión de DEFA1 (línea sombreada) en plaquetas y células Meg-01, con sus respectivos controles de isotipo (línea punteada). (C) Gráfica de barras que muestran la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de DEFA1 en plaquetas y células Meg-01. Resultados promedio de 6 experimentos. Análisis por Mann-Whitney, **p < 0.01.

7.4. La estimulación con TPO en las células Meg-01 induce la producción de partículas tipo plaqueta (PLP)

De acuerdo con los resultados anteriores, se confirmó la presencia del mRNA y la proteína de DEFA en las plaquetas humanas. Sin embargo, esta defensina podría ser endógena o exógena, es decir, las plaquetas podrían haberla heredado de los megacariocitos o podrían haberla internalizado del medio. Por lo cual, para demostrar el primer caso se utilizó el modelo de partículas tipo plaqueta (PLP), el cual es un modelo de trombopoyesis *in vitro* a partir de células Meg-01 estimuladas con TPO.

Por microscopía óptica se evaluaron las modificaciones morfológicas que presentaban las células estimuladas con TPO (Figura 7). En las células sin tratamiento hasta las 48 horas

no se observan células con elongaciones, en cambio en las células incubadas con TPO a partir de la sexta hora se observan al menos 2 células por campo visible (40x) con el tamaño y elongaciones propias de un megacariocito maduro, además de un incremento en el número de células por campo, indicando un incremento en la proliferación; a las 48 horas se observa un mayor número de células maduras por campo visible, en el fondo y alrededor de estas células se observan pequeños fragmentos circulares, los cuales podrían ser plaquetas liberadas al medio por la fragmentación de células que hayan alcanzado la madurez necesaria antes del tiempo establecido.

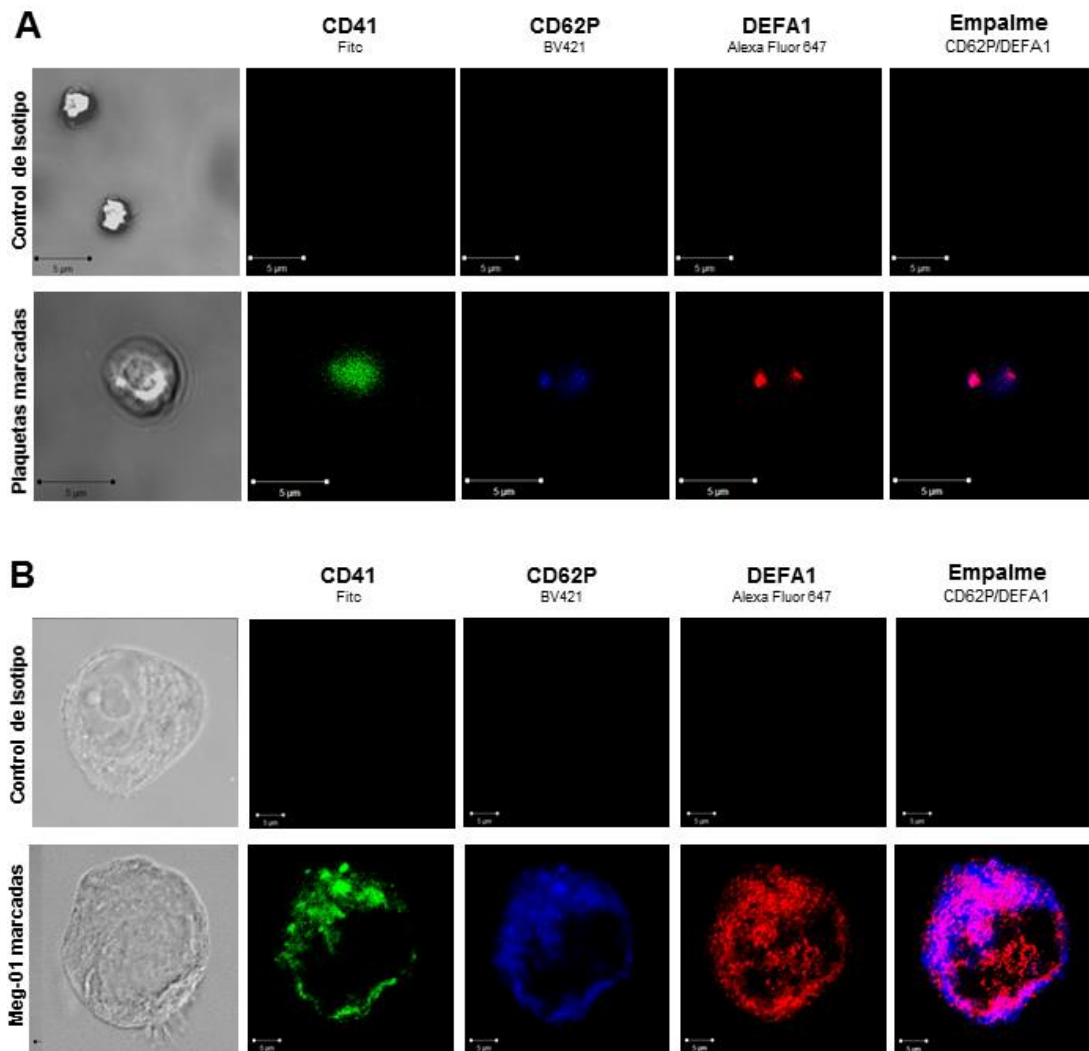


Figura 6. Localización de Defensina Alfa 1 en plaquetas y células Meg-01. Se purificaron plaquetas de sangre periférica de donadores sanos (A) y se recolectaron células Meg-01 (B) a partir de cultivos celulares. Se realizaron tinciones intracelulares con anticuerpos para identificar CD41 (verde), marcador de linaje megacariocítico; CD62P (azul), marcador de gránulos α ; y DEFA1 (rojo) mediante microscopía confocal. Experimento representativo de 2, por cada experimento se analizaron 5 células Meg-01 y 10 plaquetas. Escala = 5 μ m.

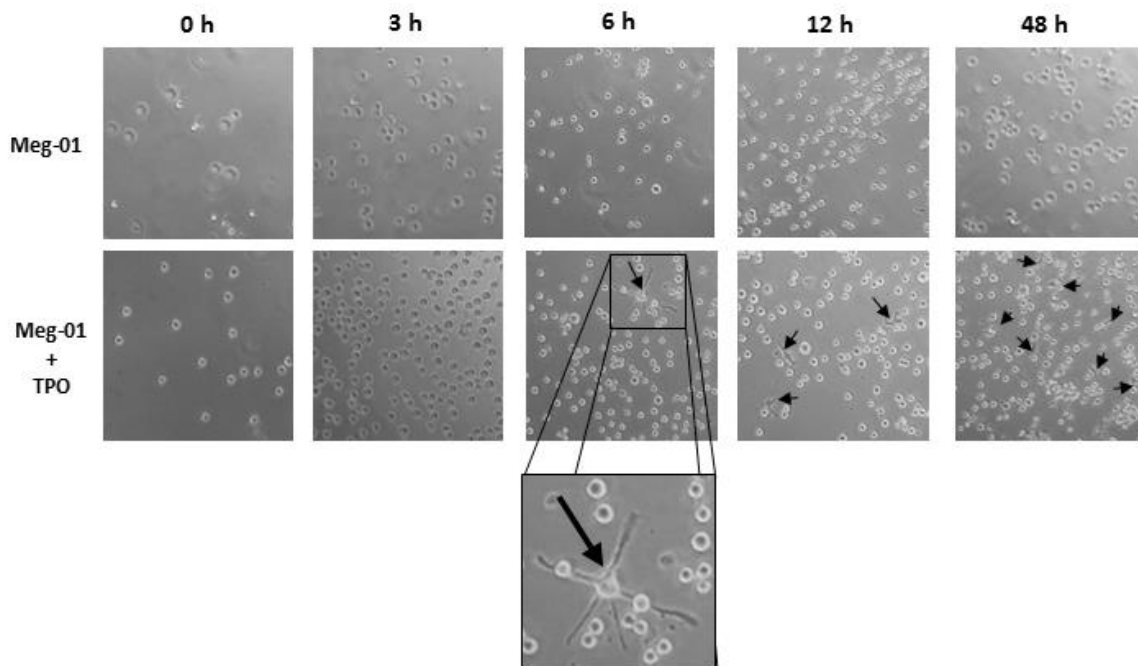


Figura 7. Cambios morfológicos inducidos con trombopoyetina en las células Meg-01. Las células Meg-01 fueron estimuladas con 100ng/mL de Trombopoyetina (TPO) por 48 horas. Los cambios morfológicos se evaluaron por microscopía óptica (25x) con o sin tratamiento con TPO en los intervalos de tiempo: 0, 3, 6, 12 y 48 horas. Las flechas indican células Meg-01 que presentan elongaciones propias de un estado mayor de madurez.

Las células fueron recolectadas y se purificaron sus PLPs siguiendo el esquema de Risitano *et al.* (5). Con el fin de evaluar que realmente fueran plaquetas se realizó un marcaje contra CD41 y mediante citometría de flujo comparamos la expresión de CD41 entre las células Meg-01 tratadas con TPO y sus PLPs (MFI = 6.62 ± 0.19 y 92.2 ± 2.1 , respectivamente). Así mismo, mediante citometría de flujo comparamos el tamaño (FSC) y la expresión de CD41 entre PLPs y plaquetas (MFI = 92.2 ± 2.1 y 35.5 ± 3.2 , respectivamente) (Figura 8). Los resultados demuestran que no hay diferencia significativa en cuanto a tamaño y porcentaje de células CD41+.

7.5. Las células Meg-01 pueden transferir Defensina Alfa 1 a sus PLPs.

Posteriormente, se procedió a evaluar la expresión relativa del mRNA de DEFA1 en las PLPs y en las células Meg-01 con o sin tratamiento con TPO por medio de RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran en el análisis una mayor expresión del mRNA de DEFA1 en las PLPs con respecto a las células Meg-01 sin tratamiento (170 veces) (Figura

9A). Caso contrario cuando se evaluó a nivel de proteína por citometría de flujo, donde se observó una tendencia a disminuir su expresión de DEFA1 cuando las células Meg-01 inician el proceso de diferenciación (Figura 9B), lo cual se demuestra al analizar las MFIs donde se muestra una MFI significativamente más alta en las células Meg-01 (16.54 ± 3.4 MFI) con respecto las PLPs (0.08 ± 0.83 MFI) (Figura 9C). Los resultados corroboran que tanto el mRNA como la proteína están presentes en las PLPs y debido a que no están en contacto con otros linajes celulares ni con algún medio que pudiera contener mRNAs, se sugiere que los heredan directamente de las células Meg-01.

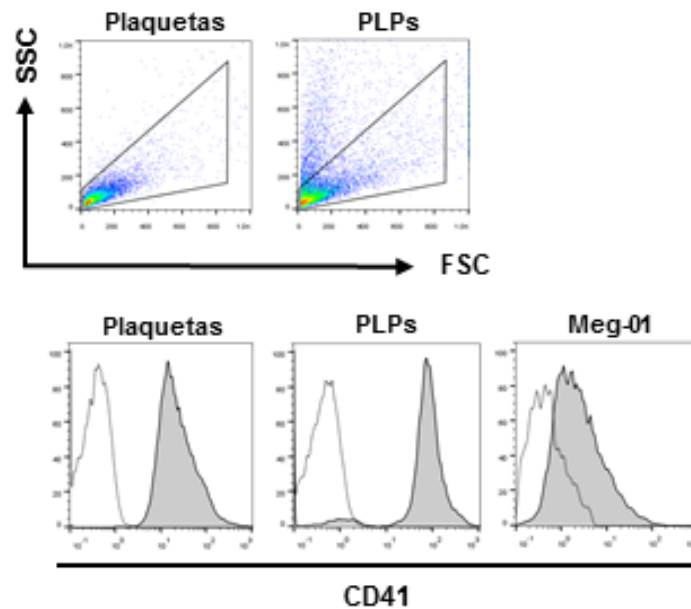


Figura 8. Comparación de tamaño y expresión de CD41 entre plaquetas y partículas tipo plaquetas. Se purificaron las PLP derivadas de la estimulación de células Meg-01 con trombopoyetina y se comparó su tamaño, complejidad y expresión de CD41 con respecto a plaquetas purificadas de donadores sanos mediante citometría de flujo. A partir de gráficos de eventos sencillos seleccionamos la región correspondiente a plaquetas en ambos casos. Los histogramas pertenecen a una muestra representativa de 6 ensayos, dónde comparamos la expresión de CD41 que presentan las PLPs con respecto a las plaquetas de un individuo sano y a las células Meg-01, no se observan diferencias entre PLPs y plaquetas.

Sin embargo, al comparar la expresión del mRNA de la defensina con la de la proteína se observa una disminución significativa de la expresión de ésta última y un incremento significativo en el contenido del mRNA a medida que madura la célula, resultados equiparables a los resultados obtenidos con las plaquetas de sangre periférica. Esto sugiere que las células Meg-01 al iniciar su proceso de maduración incrementan la síntesis de mRNAs de DEFA1 los cuales serán heredados a sus plaquetas diferenciadas.

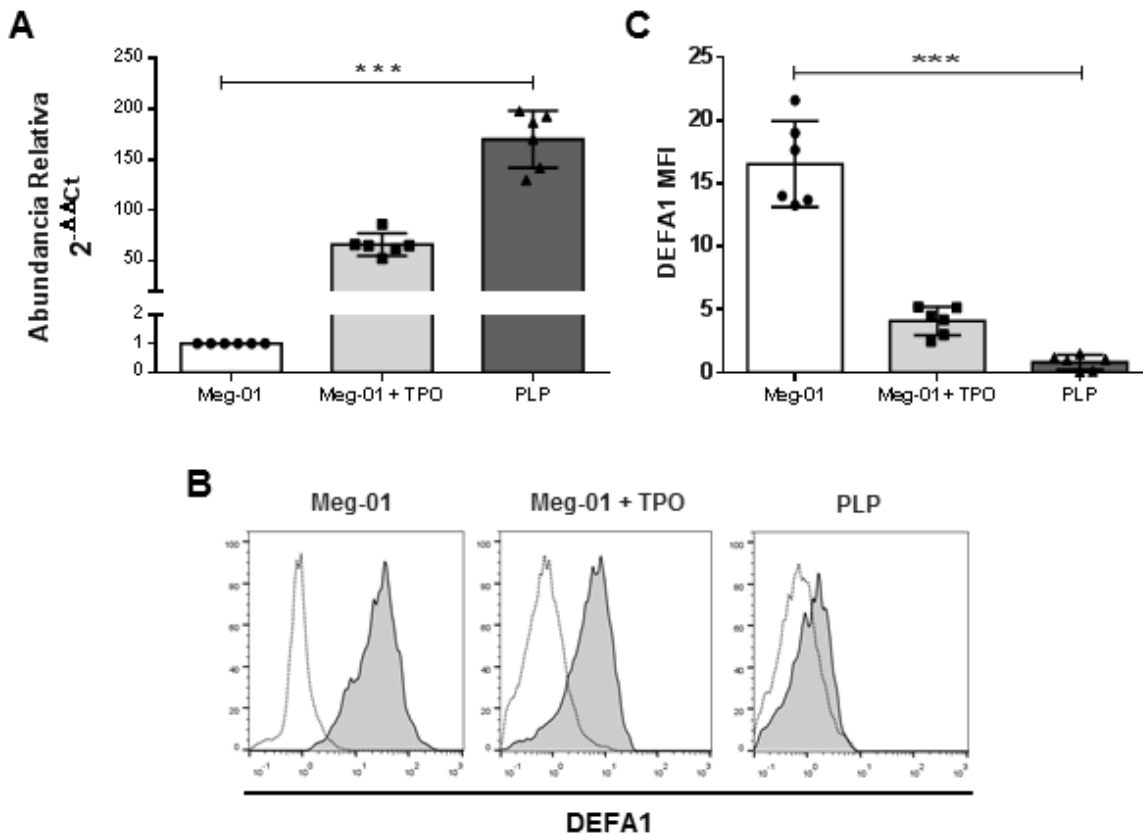


Figura 9. Comparación de la expresión de Defensina Alfa 1 entre células Meg-01 y sus partículas tipo plaquetas diferenciadas. Células Meg-01 (1×10^6) y fueron estimuladas con trombopoyetina (TPO) (100 ng/mL) durante 48 horas. Posteriormente, las PLPs derivadas de células Meg-01 fueron purificadas mediante una serie de centrifugaciones. (A) Por medio de qRT-PCR se evaluó el contenido del mRNA de DEFA1, expresado en células Meg-01 con o sin el estímulo de trombopoyetina (TPO) y en sus PLPs diferenciadas. La gráfica muestra el promedio de la expresión relativa, expresado como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, de seis experimentos, los resultados fueron normalizados con β -actina. (B) A través de tinciones intracelulares con anticuerpos se evaluó el contenido de DEFA1 en las PLPs y en las células Meg-01 con o sin tratamiento con TPO por medio de citometría de flujo, lo histogramas muestran un experimento representativo (C) Análisis de seis experimentos de citometría de flujo donde los resultados se muestran como el promedio de las intensidades medias de fluorescencia (MFI) \pm desviación standard (SD). Análisis por Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de Dunn, $***p < 0.001$.

7.6. Las Partículas tipo Plaqueta pueden interiorizar Defensina Alfa 1 del medio

Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos de la expresión de DEFA1 por citometría entre las PLPs y plaquetas de sangre periférica. Los resultados demuestran que las plaquetas tienen una mayor expresión de DEFA1 (5.25 ± 0.98 MFI, $34.25 \pm 8.3\%$) con respecto a las PLPs (0.32 ± 0.83 MFI, $9.63 \pm 1.25\%$) (Figura 10A). Por lo cual, se

realizaron ensayos de absorción de la defensina para evaluar si las plaquetas de estos individuos obtenían esos niveles de DEFA1 debido al contacto con un medio rico en defensinas. Para ello, se evaluó la concentración de DEFA1 en los sueros de los 6 individuos que participaron en los ensayos de citometría de flujo (Figura 10B). Se produjeron PLPs y se incubaron con los sueros para posteriormente evaluar la expresión de DEFA1 en las PLPs por citometría de flujo, de manera intracelular y superficial, además, se cuantificó la concentración de DEFA1 en los sobrenadantes.

Los resultados de citometría de flujo indican un incremento significativo del contenido de DEFA1 intracelular a los 30 minutos de incubación con el suero (0.79 ± 0.14 MFI) con respecto a su control sin suero (0.28 ± 0.07 MFI); en la superficie, los niveles de DEFA1 se incrementaron significativamente a partir de los 15 minutos de incubación con los sueros (0.33 ± 0.04 MFI), la cual se fue incrementando a los 30 min (0.42 ± 0.06 MFI), 1 hora (0.43 ± 0.03 MFI) y 3 horas (0.52 ± 0.03 MFI) con respecto a su control sin suero (0.005 ± 0.002 ; 0.038 ± 0.015 ; 0.043 ± 0.006 y 0.065 ± 0.042 MFI respectivamente) (Figura 10C). Sin embargo, al analizar el porcentaje de células positivas se observó un incremento significativo del porcentaje de PLPs que presentaban DEFA1 en su interior a partir de los 15 minutos cuando éstas eran tratadas con el suero de los donadores. Este porcentaje disminuyó en tiempos posteriores, pero mantienen valores significativamente superiores con respecto al control de PLPs sin tratamiento con suero. En las PLPs sometidas a una tinción superficial, este porcentaje se incrementó a partir de los 15 minutos sin observar disminución en los tiempos de incubación posteriores (Figura 10D).

A pesar de que las PLPs tratadas con suero mostraron un incremento de los niveles de DEFA1 en su superficie, lo cual nos sugiere un posible anclaje de DEFA1 a la superficie plaquetaria, este incremento seguía siendo menor con respecto al incremento observado de manera intracelular a los 30 min. Al evaluar las concentraciones de DEFA1 en los sobrenadantes observamos una disminución significativa a los 30 minutos de incubación (1.72 ± 0.56 ng/mL), que al compararla con nuestro control sin PLPs (4.77 ± 0.09 ng/mL) podemos confirmar que esta disminución se debe a la interiorización de la defensina y no a la degradación de la proteína. Por otra parte, después de 1 h de incubación con el suero, la concentración de DEFA1 en los sobrenadantes se incrementa sugiriendo que después de su absorción la plaqueta podría secretar nuevamente el péptido antimicrobiano (Figura 10E). A través de este modelo in vitro, se sugiere que las

plaquetas en sangre podrían captar del medio extracelular parte de la DEFA1 que contienen.

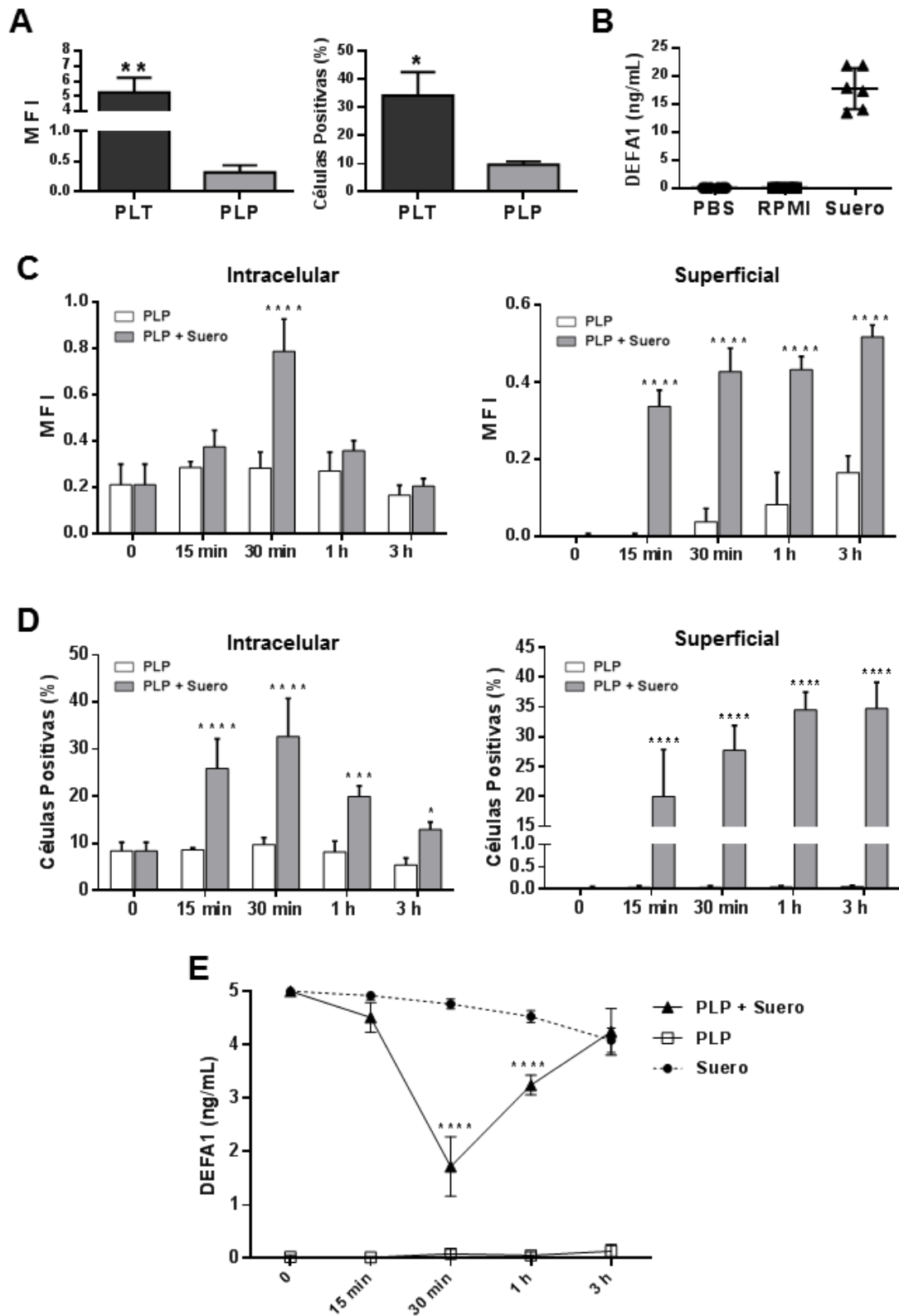


Figura 10.- Evaluación de la capacidad de interiorización de la Defensina Alfa 1 en partículas tipo plaqueta. (A) Se produjeron partículas tipo plaqueta [PLP] y se purificaron plaquetas de sangre de donadores sanos [PLT] y se les realizaron tinciones intracelulares para evaluar la expresión de DEFA1 por citometría de flujo. Análisis de seis experimentos de citometría de flujo donde los resultados se muestran como el promedio de las intensidades medias de fluorescencia (MFI) \pm desviación standard (SD), la diferencia significativa se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. (B) Se recolectaron los sueros de seis individuos sanos y se evaluó la concentración de DEFA1 mediante ensayos de ELISA. Los sueros fueron normalizados a una concentración de 5ng/mL de DEFA1, en ellos se incubaron las PLPs por 15, 30, 60 y 180 minutos. Posteriormente, se realizaron tinciones intracelulares y superficiales para DEFA1 en las PLPs y se analizó por citometría de flujo, las gráficas muestran (C) MFI \pm SD y (D) el porcentaje de células positivas para DEFA1. (E) La concentración de DEFA1 en los sobrenadantes donde fueron incubadas las PLPs con el suero fue evaluado mediante ELISA. Las PLPs sin suero fueron utilizadas como controles. La diferencia significativa entre PLPs y PLPs con suero en los ensayos de citometría, así como entre las concentraciones de DEFA1 en los sobrenadantes de las PLPs con suero (\blacktriangle) y el suero sin PLPs (\bullet) fue determinada mediante una prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

7.7. Las plaquetas, las células Meg-01 y las partículas tipo plaqueta secretan Defensina Alfa 1 posterior a su activación con diferentes agonistas

Las plaquetas son capaces de liberar al medio diversas proteínas cuando son activadas debido al reconocimiento de diversos agonistas, ya sean proteínas almacenadas en sus gránulos o de síntesis de novo. Una de las proteínas más importantes para la activación plaquetaria y posterior liberación del contenido de sus gránulos es la trombina, de ahí que a algunas proteínas se les conozca como “proteínas microbicidas plaquetarias inducidas por trombina” (tPMP) (31).

Tomando esto en cuenta, además de los resultados que confirman que DEFA1 se encuentra dentro de los gránulos alfa, se evaluó la capacidad de secreción de DEFA1 por parte de las células Meg-01, PLPs y plaquetas de sangre periférica tras su estimulación con trombina, ADP y LPS, moléculas conocidas por causar la activación y agregación plaquetaria. Los resultados que se obtuvieron de los ensayos de ELISA con los sobrenadantes, muestran que los tres tipos celulares son capaces de secretar DEFA1 tras su estimulación. Las células Meg-01 liberaron cantidades significativamente más altas de DEFA1 cuando son estimuladas con trombina y LPS (23.16 ± 4.87 ng/mL y 5.72 ± 4.02 ng/mL respectivamente) (Figura 11A). Por otra parte, las PLPs respondieron con una mayor secreción de DEFA1 cuando son tratadas con ADP (19.03 ± 10.02 ng/mL) y con LPS (6.64 ± 3.94 ng/mL) (Figura 11B).

En cuanto a las plaquetas purificadas de sangre de donadores sanos, éstas son capaces de reaccionar ante los tres estímulos (trombina, ADP y LPS) liberando DEFA1 al medio de manera significativa (17.45 ± 7.22 ng/mL, 18.12 ± 9.54 ng/mL y 15.12 ± 3.8 ng/mL respectivamente) (Figura 11C). Estos resultados indican que las células de la línea megacariocítica son capaces de secretar DEFA1 al medio cuando son activadas.

Por otra parte, uno de los principales activadores del megacariocito es la trombopoyetina (TPO), por lo cual, decidimos evaluar si las células Meg-01, megacarioblastos capaces de madurar a megacariocitos, podían ser capaces de secretar DEFA1 durante su proceso de maduración. Para ello, se cultivaron células Meg-01, se les dio el mismo tratamiento con TPO que cuando se produjeron PLPs y se cuantificó DEFA1 en los sobrenadantes a diferentes tiempos. Los resultados muestran que los megacariocitos son capaces de liberar DEFA1 cuando son tratados con TPO e inclusive la concentración de DEFA1 se incrementa con mayor tiempo de exposición a la TPO (Figura 11D).

7.8. La Defensina Alfa 1 secretada por las plaquetas tiene actividad antimicrobiana hacia *Escherichia coli*.

Finalmente, para evaluar el potencial antimicrobiano de la DEFA1 plaquetaria se purificaron plaquetas de sangre periférica de donadores clínicamente sanos y fueron tratadas con trombina, se recuperaron los sobrenadantes y en ellos se eliminó, o no, la defensina con anticuerpos mediante panning. En ambos sobrenadantes se incubaron 1×10^5 UFCs de *E. coli* durante dos horas, tomando alícuotas cada 30 minutos y sembrándose en placas de agar nutritivo, para posteriormente realizar el conteo de UFCs.

En las placas se observó que a partir de los 30 minutos hubo una disminución significativa de las UFCs cuando las bacterias eran incubadas con los sobrenadantes que contienen la defensina con respecto al control de bacterias sin sobrenadantes. En contraste, cuando las bacterias son incubadas con los sobrenadantes sin la defensina hay un incremento significativo en el número de UFCs a partir de los 90 minutos con respecto a las bacterias incubadas con el sobrenadante completo. Sin embargo, en comparación con las bacterias control sus UFCs son menores, debido a que, tras su activación, las plaquetas tienen la

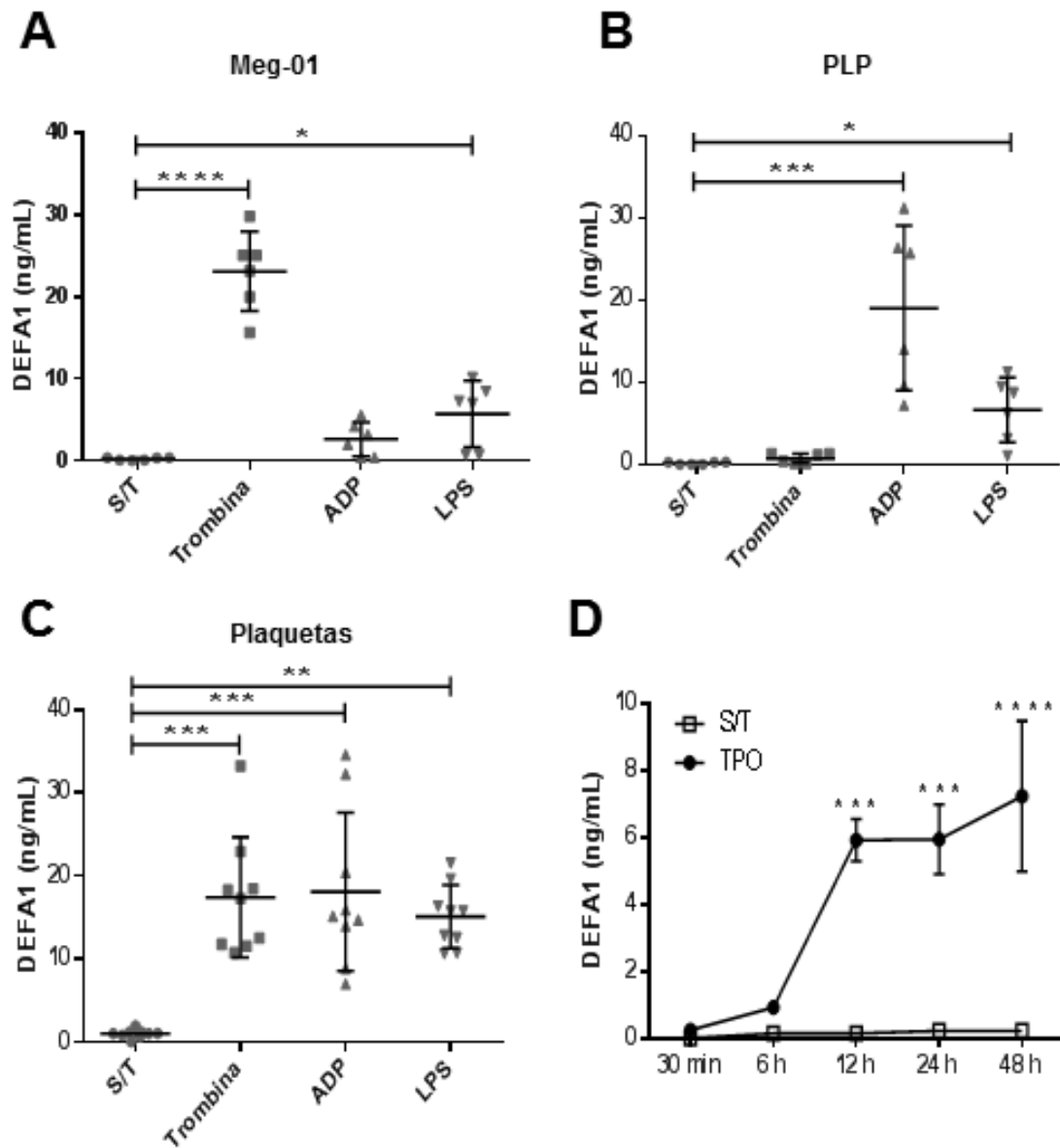


Figura 11.- Ensayos de liberación de Defensina Alfa 1 por de las células Meg-01, partículas tipo plaquetas y plaquetas de sangre periférica. (A) Células Meg-01, (B) partículas tipo plaqueta (PLP) y (C) plaquetas purificadas de sangre de donadores sanos fueron estimuladas ya sea con 1 UI/mL de Trombina, 1 $\mu\text{g/mL}$ de ADP ó 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 30 min y se evaluó la liberación de defensina alfa 1 (DEFA1) en los sobrenadantes por ensayos de ELISA. Los resultados se muestran como el promedio de 9 experimentos individuales para las plaquetas y el promedio de 6 para células Meg-01 y PLPs \pm SD. (D) Células Meg-01 fueron estimuladas con 100 ng/mL de trombopoyetina (TPO) durante 30 minutos, 6, 12, 24 y 48 horas, en los sobrenadantes se evaluó la concentración de DEFA1 mediante ensayos de ELISA. Los resultados se muestran como el promedio de 6 experimentos individuales en cada caso \pm SD. (S/T: Sin tratamiento). Análisis por Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn-Sidak, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

capacidad de liberar diversas proteínas con actividad microbica (Figura 12). Indicando que la defensina alfa que secretan las plaquetas humanas tiene actividad microbica hacia bacterias Gram negativas, en específico *E. coli*.

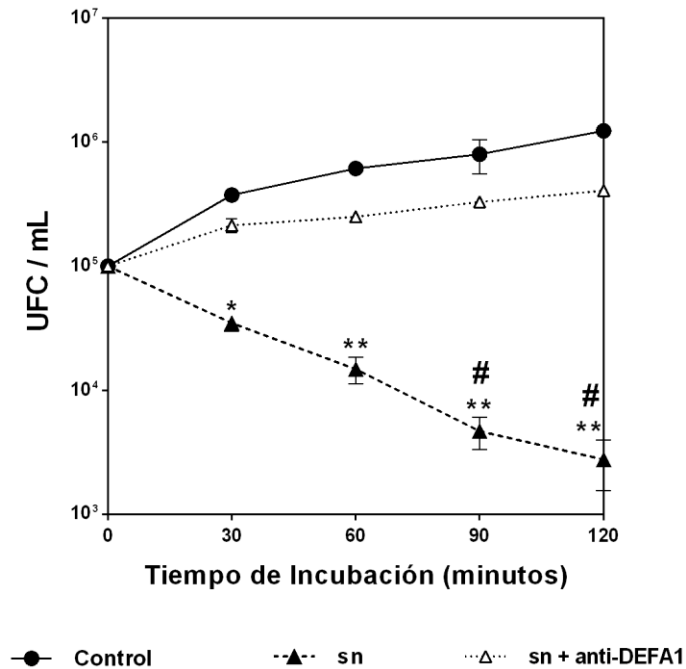


Figura 12.- Cinética de la actividad antimicrobiana de Defensina Alfa 1 plaquetaria contra *Escherichia coli*. 1×10^5 unidades formadoras de colonias de *E. coli* fueron preincubadas a 37°C por 30, 60, 90 o 120 minutos con los sobrenadantes de plaquetas purificadas de donadores clínicamente sanos estimuladas con 1 U/mL of trombina los cuales contienen DEFA1 (15 ng/mL) (\blacktriangle) o con los mismos sobrenadantes con DEFA1 neutralizada (\triangle). Medio RPMI (\bullet) fue usado como control. Al finalizar cada preincubación se tomaron 20 μ L de los sobrenadantes o medio de control y se sembraron por dispersión en placas de agar nutritivo, las cuales se incubaron por 18h y se determinó el número de UFC/mL. Los valores muestran el promedio de 4 experimentos independientes. La diferencia significativa fue determinada mediante la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, dónde * $p < 0.01$ y ** $p < 0.0001$ entre (\blacktriangle) y (\bullet); # $p < 0.01$ entre (\blacktriangle) y (\triangle).

8. Discusión

Las plaquetas son células cuyo papel más conocido reside en la hemostasia, sin embargo, se ha demostrado que cumplen diferentes funciones en la respuesta del hospedero contra infecciones, una de ellas es la liberación de proteínas con actividad microbicida, dentro de las cuales no había sido descrita alguna defensina de la familia alfa. Además, las plaquetas son células anucleadas, por lo cual si se identificaba la defensina alfa 1 (DEFA1) en ellas, existía la posibilidad de que también se encontrara en los megacariocitos, linaje celular donde, hasta el momento, no se han identificado péptidos antimicrobianos.

Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez la presencia de la proteína y el mRNA de defensina alfa 1 en las plaquetas humanas de sangre periférica y en la línea celular Meg-01. Así mismo, se confirmó que los megacariocitos son capaces de expresar DEFA1 y transferir esta proteína a sus plaquetas diferenciadas mediante el modelo de producción de partículas tipo plaqueta (PLP) a partir de células Meg-01, a través de este mismo modelo también se comprobó que las PLPs pueden interiorizar la DEFA1 sugiriendo que las plaquetas en sangre también podrían captarla del medio. Esta defensina se encuentra dentro de los gránulos α de las plaquetas y de las células Meg-01, éstas última también la contienen en su citoplasma. Por último, comprobamos que estas poblaciones celulares son capaces de secretar DEFA1 al medio cuando son activadas con diversos agonistas, inclusive las células Meg-01 pueden liberarla cuando son estimuladas con trombopoyetina. Esta defensina es liberada al medio en su forma biológicamente activa, capaz de disminuir las UFCs de la bacteria *Escherichia coli*.

Cabe destacar que la presencia del transcrito de DEFA1 en las plaquetas fue de suma importancia, ya que las defensinas alfa se encuentran predominantemente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y son producidos por sus precursores en médula ósea (70), aunque también se han identificado en células NK, células $\gamma\delta$ T, células B y monocitos (71). A diferencia de la defensina β 1 que se encuentra en el citoplasma plaquetario (67), DEFA1 se localizó en los gránulos α de las plaquetas de individuos sanos, sugiriendo que las plaquetas podrían secretarla a partir de la estimulación con agonistas plaquetarios (trombina, ADP, etc.) y que, además, podrían adquirirla de manera exógena, similar a como la adquieren los gránulos azurófilos de los neutrófilos; mientras que en las células

Meg-01 se localizó en los gránulos α y en su citoplasma, sugiriendo que los megacariocitos podrían liberar DEFA1 al medio a través de agonistas que no forzosamente induzcan su desgranulación, como la trombopoyetina o la eritropoyetina.

Además, las plaquetas tienen una estructura membranal única que permite el transporte de pequeñas moléculas, como es el caso de las moléculas de MHC de clase I solubles que se encuentran en el plasma y que su absorción puede tener implicaciones clínicas importantes (7), dejando la posibilidad de que parte de su repertorio de RNA citoplasmático y proteínas intracelulares provengan de otras células en sangre periférica o que este repertorio pueda ser transportado de la plaqueta a otras células. Debido a esto, decidimos confirmar su presencia en las células Meg-01 y en sus PLPs diferenciadas, las cuales al ser de reciente creación y no haber tenido contacto con otros linajes celulares o con algún medio que pudiera contener defensinas, nos reafirmó que la DEFA1 es producida por los megacariocitos y éstos son capaces de transferirla a sus plaquetas diferenciadas.

Al realizar los ensayos de absorción observamos que las PLPs podían interiorizar DEFA1 del medio, sugiriendo que las plaquetas en sangre también podrían captar defensinas exógenas. En diversos trabajos se ha demostrado que las células pueden adquirir defensinas exógenas en diferentes maneras, incluyendo la fagocitosis de gránulos azurófilos (80) y la pinocitosis no selectiva de proteínas catiónicas encontradas en el suero, como en el caso de BPI y lactoferrina (81). Además, es bien sabido que la endocitosis es un proceso importante para el ingreso de algunas proteínas hacia los gránulos α , como el fibrinógeno y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros (78); este proceso es selectivo, ya que se ha demostrado que las plaquetas no interiorizan todas las proteínas en plasma a pesar de que se encuentren en altas concentraciones, tal es el caso de la albumina, (79). Estos resultados en conjunto sugieren que el megacariocito en médula ósea es capaz de expresar el mRNA y la proteína de DEFA1 y transferirla a sus plaquetas diferenciadas, cuando las plaquetas se encuentran en circulación éstas son capaces de incrementar su contenido de DEFA1 al captar DEFA1 exógeno que se encuentra inmerso en el plasma.

Curiosamente, tanto en las plaquetas de sangre periférica como en las PLPs se observó un incremento significativo en la cantidad de transcritos de DEFA1 con respecto a las

células Meg-01, quedando la duda de si las plaquetas serían capaces de sintetizar la proteína a partir de todos los transcritos. También esta podría ser otra forma en que las células PMN incrementan sus concentraciones intracelulares de DEFA1, no necesariamente incrementando sus niveles de proteína, sino sus niveles de mRNA, ya que se ha demostrado que las plaquetas son capaces de transferir mRNAs a través de microvesículas hacia otros linajes celulares que tengan la capacidad de traducirlos a proteínas (5). Por otra parte, la disminución de mRNA de DEFA1 en las células Meg-01 cuando se estimulan con TPO podría deberse a que se esté produciendo más proteína de la capacidad que tiene la célula de sintetizar RNA, ya que observamos en los ensayos de secreción que a medida que se incrementa el tiempo de exposición de las células Meg-01 a la TPO también se incrementa la liberación de la defensina. Además, el proceso de trombopoyesis, mediado por TPO, requiere que el megacariocito inicie un proceso apoptótico dependiente, o no, de caspasas (82-84), por lo que estas células estarán enfocadas en la síntesis *de novo* de proteínas pro-apoptóticas, por lo que el contenido inicial de mRNA de DEFA1 en el megacariocito, previo a la estimulación con TPO, podría repartirse entre la traducción de la proteína en la misma célula y a su compartimentalización para su transferencia a las plaquetas de reciente creación.

Los resultados de este trabajo también demuestran que las plaquetas tienen la capacidad para secretar la defensina al medio, para ello requiere que la plaqueta se encuentre en un estado activado, ya sea con trombina, ADP o LPS. Estos resultados corroboran los resultados que muestran que DEFA1 se encuentra en los gránulos α , ya que se sabe que los 3 agonistas inducen una pronta activación y posterior liberación del contenido de sus gránulos hacia el medio extracelular (16). Esto concuerda con la información que se tiene sobre la liberación de proteínas con actividad microbicida inducidas por trombina (59).

Además, se ha demostrado en trabajos anteriores que las plaquetas humanas durante un proceso infeccioso-inflamatorio se encuentran en un estado mayor de activación que inducirá una modificación su fenotipo inmunológico, incrementando la expresión de receptores para el reconocimiento de patógenos, en especial TLR4 (85-87), cuyo ligando es el LPS, así como una acumulación de las mismas células en el sitio de infección incrementando la concentración de proteínas microbicidas en ese sitio y promoviendo una defensa antimicrobiana directa por parte del hospedero (88-90). Por lo cual, los resultados que muestran un incremento en la liberación de DEFA1 ante la activación con LPS

sugieren un papel fundamental de las células de la línea megacariocítica para la resolución de procesos inflamatorios mediados por microorganismos Gram negativos.

Así mismo, si las plaquetas son capaces de secretar DEFA1 tras su activación con agonistas derivados de una lesión endotelial (trombina y ADP), entonces los niveles en suero de esta defensina se deberían encontrar elevados en patologías donde la inflamación no provenga de un proceso infeccioso y las plaquetas se encuentren en un mayor estado de activación, como en las enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Sin embargo, no en todas estas patologías se encuentran elevados los niveles en suero de DEFA1, más aún, en individuos con obesidad que presentan un alto riesgo de generar enfermedades cardiovasculares se ha detectado una disminución significativa de DEFA1 en suero a medida que se incrementan los niveles séricos de colesterol (91).

Esto sugiere que la defensina podría estar siendo secuestrada al momento de su liberación, ya que DEFA1-3 tienen una alta afinidad por moléculas glicosiladas (glicolípidos, glicoproteínas y proteoglicanos principalmente), por lo que las moléculas de DEFA1 liberadas suelen unirse al glicocalix superficial de la célula que las secretó o al de las células cercanas (72). En trabajos recientes se ha demostrado que las defensinas alfa pueden unirse a las plaquetas induciendo un incremento en la expresión superficial de Selectina-P de manera dosis dependiente, la agregación plaquetaria y sensibilizando a las plaquetas para tener una mayor respuesta ante un estímulo con ADP, por lo cual las DEFA1-3, por sí solas, son capaces de activar a las plaquetas de manera independiente a la vía de la trombina (92). Así mismo, el tratamiento con DEFA1-3 induce la unión del fibrinógeno a las plaquetas de manera dosis y tiempo dependiente, mediante la vía del receptor mayor de fibrinógeno GPII/bIIa. Conjuntamente, el tratamiento con las defensinas inducirá la movilización de calcio y desgranulación en las plaquetas, acompañada por el incremento CD40L superficial y la liberación de su forma soluble (93). Como consecuencia habrá un incremento en la formación de asociaciones entre plaquetas y monocitos en sangre periférica.

Debido a que las plaquetas también tienen la capacidad de secretar DEFA1 tras su activación, ésta, a su vez, podría unirse a la superficie plaquetaria incrementando su estado de activación en un efecto denominado "rebinding". Este proceso podría contribuir a la formación de estructuras tipo amiloides, junto con el fibrinógeno y la trombospondina

1 (TSP1), las cuales tienen la capacidad de capturar diferentes microorganismos, pero también la de producir microoclusiones vasculares (93). Este fenómeno podría tener una gran relevancia clínica, ya que la DEFA1 plaquetaria podría desencadenar la activación de plaquetas vecinas y formación de trombos, contribuyendo a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias.

Por otra parte, se demostró que los megacariocitos también pueden secretar DEFA1 cuando son tratados con TPO, lo cual sugiere dos cosas: los megacariocitos también son una fuente de producción de defensinas alfa en médula ósea, y que durante el proceso de trombopoyesis se lleva a cabo también la liberación de DEFA1. Se cuenta con evidencia donde se muestra que la médula ósea humana presenta una mayor concentración de defensinas alfa con respecto a sus concentraciones en plasma de sangre periférica sugiriendo que una fuente importante de defensinas en plasma proviene de médula ósea (94), por lo cual una de las funciones de los megacariocitos durante la trombopoyesis podría ser la liberación de DEFA1 para incrementar sus concentraciones en plasma de sangre periférica. Hasta el momento, se desconoce si los megacariocitos son capaces de desempeñar funciones inmunorreguladoras, por lo cual la liberación de DEFA1 podría ser una de ellas, ya que se ha demostrado que las DEFA1-3 secretadas por neutrófilos tienen la capacidad de inhibir la secreción de IL-6, IL- β y NO mediante la inhibición de la traducción de las mismas en macrófagos derivados de monocitos (95, 96), por lo cual los megacariocitos también podrían tener la capacidad de disminuir el proceso inflamatorio al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias. En cuanto a los efectos fisiológicos de las defensinas en médula ósea, sólo un estudio ha encontrado que las defensinas alfa pueden inhibir la diferenciación de monocitos en individuos con leucemia mielomonocítica crónica (97), sin embargo, el impacto de DEFA1 en médula ósea, en la hematopoyesis o en neoplasias hematopoyéticas requiere de más estudios a profundidad.

Como se mencionó anteriormente, DEFA1 puede unirse a la superficie plaquetaria e inducir su activación, por lo cual durante la trombopoyesis podría liberarse también alguna proteína que impida esta unión para evitar la activación plaquetaria. Nuestro estudio también tiene la limitante de que, para emular el proceso de trombopoyesis, la línea celular Meg-01 fue estimulada sólo con TPO y el estímulo no se llevó a cabo en un biorreactor como sugieren los trabajos de Nakagawa *et. al*, dónde remarcan la importancia que tiene el microambiente rico en citocinas y factores de crecimiento en el

nicho hematopoyético para la producción en masa de plaquetas funcionales, en términos de hemostasia; así mismo, la regulación del pH, temperatura y el cambio de presión son importantes para simular la migración del megacariocito inmaduro del nicho osteoblástico al nicho vascular en médula ósea y la liberación de las plaquetas al torrente sanguíneo (98, 99). Debido a esto, utilizar únicamente trombopoyetina para producir plaquetas a partir de células Meg-01 podría interferir con los niveles fisiológicos reales que libera el megacariocito en médula ósea durante su maduración y posterior fragmentación en plaquetas en el torrente sanguíneo.

Finalmente, se evaluó el potencial microbicida de la defensina alfa 1 liberada por las plaquetas, demostrando que este péptido antimicrobiano es secretado por las plaquetas en su forma activa y es capaz de disminuir la proliferación de bacterias Gram negativas, de forma equiparable a las defensinas producidas por leucocitos (74) y a las recombinantes (100). Sabemos que las principales funciones que se les adjudica a las defensinas en la respuesta inmune innata son la permeabilización de la membrana bacteriana y la suspensión abrupta de la síntesis de DNA, RNA y proteínas bacterianas acompañada de la pérdida del potencial formador de colonias (74).

Conjuntamente, las defensinas también tienen un efecto quimiotáctico en células mononucleares y neutrófilos, e inducen la migración de células T al sitio de infección (75). Sin embargo, desconocemos si estas funciones también se les pueden conferir a las defensinas secretadas por plaquetas, por lo tanto, se requieren más estudios para comprobar la funcionalidad de la defensina alfa 1 secretada por estas células.

Las plaquetas igualmente se conocen por tener diferentes funciones en respuesta a las infecciones virales. La interacción directa o indirecta con virus resultará en la activación y desgranulación plaquetaria, por lo cual, la mayor parte de su función antiviral reside en la liberación de quincinas (PK) y proteínas microbidas que contiene en sus gránulos α . Una de las PKs más importantes en estos procesos es PF4 (CXCL4), molécula que tiene la capacidad de unirse a gp120, sitio de unión a CD4, impidiendo la infección con HIV-1 en células T (101, 102). Otros mecanismos indirectos que tienen las plaquetas para evitar las infecciones virales derivan del reclutamiento y estimulación de otras poblaciones celulares gracias al incremento superficial de la Selectina-P, de la liberación de CD40L y diversas PKs (103).

Dentro de estas PKs secretadas ante una infección por virus, ahora sabemos que también se podría encontrar DEFA1, aumentando su arsenal de defensa antiviral. El efecto antiviral de DEFA1 se ha evaluado en diversos procesos infecciosos, pero del que se tienen más evidencias es el caso del HIV-I, donde los efectos inhibitorios en la replicación del virus incluyen su inactivación directa, mediante la inducción de la producción de MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES que compitan con el virus por la unión con CCR5 (76), y la neutralización de las células blanco de la infección, mediante la interferencia con la señalización de la proteína C cinasa (PKC) (104), este último mecanismo no se ha corroborado dentro de la defensa viral plaquetaria. Inclusive, la falta de control en la diseminación de la infección viral en estos individuos podría deberse a una disminución de la DEFA1 en suero, la cual podría estar relacionada a la trombocitopenia persistente que padecen los individuos HIV+ en etapas avanzadas (105).

Los resultados de este trabajo nos demuestran que las plaquetas y megacariocitos son capaces de producir y secretar defensina alfa 1, pero se requieren más estudios para caracterizar funciones previamente desconocidos en el linaje celular megacariocítico en la respuesta inmunológica y verificar su impacto en el desarrollo de diferentes enfermedades.

9. Conclusiones

- Las plaquetas y megacariocitos humanos contienen el mRNA y la proteína de defensina alfa 1.
- En las plaquetas, la defensina alfa 1 se encuentra dentro de los gránulos alfa
- En los megacariocitos, la defensina alfa 1 se encuentra dentro de los gránulos alfa y en el citoplasma.
- A través del modelo de partículas tipo plaqueta, se confirmó la transferencia de la defensina alfa 1 de los megacariocitos a sus plaquetas diferenciadas.
- Las plaquetas y los megacariocitos tienen la capacidad de secretar defensina alfa 1 cuando son estimulados con trombina, ADP y LPS.
- Las plaquetas tienen la capacidad de interiorizar defensina alfa 1.
- Las plaquetas al ser estimuladas con trombina secretan defensina alfa 1 actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

10. Bibliografía

1. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 2005. 115:3378-3384.
2. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost.*, 2009. Suppl 1:206-209.
3. Ravi S, Chacko B, Sawada H, Kramer PA, Johnson MS, Benavides GA, O'Donnell V, Marques MB, Darley-Usmar VM. Metabolic Plasticity in Resting and Thrombin Activated Platelets. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0123597.
4. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol.*, 2012. 191:861-874.
5. Risitano A, Beaulieu L. M., Vitseva O., Freedman J. E. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood*. 2012; 119:6288-6295.
6. Yang M, Li K, Chik KW, Zhao DC, Yan M, Li CK, Shing MM, Fok TF, Yuen PM. The Immunological Study of Megakaryocytes. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2000. 8(1), 5-9.
7. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.*, 2011; 11(4):264-274.
8. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008. 111(3):1227-1233.
9. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *Journal of Experimental Medicine*. 2017, 214(8), 2193-2204.
10. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258:7155-7160.
11. Andersson PO, Olsson A, Wadenvik H. Reduced transforming growth factor-beta1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2002. 116:862-867.
12. Ling Y, Cao X, Yu Z, Ruan C. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol.* , 2007. 79:310-316.
13. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, Stipa E, Laura Evangelista M, Abruzzese E, Amadori S. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*. 2008. 112:1147-1150.
14. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-1886.
15. Kao KJ, Cook DJ, Scornik JC. Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood*. 1986; Sep;68(3):627-632.
16. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, Masse JM, Savidge GF, Cramer EM.. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest*. 1989; 84(4):1320-1324.
17. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*. 2009; 113(12):2835-2842.
18. Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RH, Vornhagen R, Clemetson KJ. Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in lambda gt11. Confirmation of the platelet derivation by identification of GPIb coding mRNA and cloning of a GPIb coding cDNA. *ThrombHaemost*, 1989. 61:448-453.

19. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol.*, 2008. 181(5):3495-3502.
20. Coppinger JA, O'Connor R, Wynne K, Flanagan M, Sullivan M, Maguire PB, Fitzgerald DJ, Cagney G. Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood.* 2007. 109:4786-4792.
21. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood.* 2003; 101(6):2285-2293.
22. Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, Nagalla S, Delgrosso K, Ertel A, Kupper J, Jing Y, Londin E, Loher P, Chen HW, Fortina P, Rigoutsos I. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics.* 2013 16; 14:1.
23. Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD, Wang Y, Chen Z, Croce K, Sakuma M, Shi C, Zago AC, Garasic J, Damokosh AI, Dowie TL, Poisson L, Lillie J, Libby P, Ridker PM, Simon DI. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation.* 2006; 113:2278–2284.
24. Colombo G, Gertow K, Marenzi G, Brambilla M, De Metrio M, Tremoli E, Camera M. Gene expression profiling reveals multiple differences in platelets from patients with stable angina or non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Res.* 2011; 128:161–168.
25. Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J, Solomon MA, Suffredini AF, Danner RL, Kato G, Munson PJ, Morris SM Jr, Gladwin MT. Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation.* 2007; 115:1551–1562.
26. Lood C, Amisten S, Gullstrand B, Jönsen A, Allhorn M, Truedsson L, Sturfelt G, Erlinge D, Bengtsson AA. Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease. *Blood.* 2010; 116:1951–1957.
27. Freedman JE, Larson MG, Tanriverdi K, O'Donnell CJ, Morin K, Hakanson AS, Vasani RS, Johnson AD, Iafrazi MD, Benjamin EJ. Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the Framingham heart study. *Circulation.* 2010 Jul 13; 122(2):119-129.
28. Beaulieu LM, Lin E, Mick E, Koupenova M, Weinberg EO, Kramer CD, Genco CA, Tanriverdi K, Larson MG, Benjamin EJ, Freedman JE. Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1 β regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Mar; 34(3):552-564.
29. Koupenova M, Mick E, Mikhalev E, Benjamin EJ, Tanriverdi K, Freedman JE. Sex Differences in Platelet Toll-Like Receptors and Their Association With Cardiovascular Risk Factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2015. Apr; 35(4):1030-1037.
30. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res.* 2013. 112(11):1506–1519.
31. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology.* 2014, 12(6), 426-437.
32. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F. Bench-to bedside review: Platelets and active immune functions-new clues for immunopathology?. *Critical care.* 2013; 17(4), 236.
33. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011; 105(Suppl 1):S13–33.
34. Phipps RP. Platelets at the interface between thrombosis, inflammation and immunity. *Thromb Res.* 2011; 127:179.

35. McNicol A, Israels SJ. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2008; 8:99–117.
36. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012; 8(9), 534-542.
37. Refaai MA, Phipps RP, Spinelli SL, Blumberg N. Platelet transfusions: impact on hemostasis, thrombosis, inflammation and clinical outcomes. *Thromb Res*. 2011; 127:287–291.
38. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012; 92:1167–1175.
39. de Bruijne-Admiraal L, Modderman P, Von dem Borne A, Sonnenberg A. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood*. 1992; 80:134–142.
40. Shah SA, Page CP, Pitchford SC. Platelet–eosinophil interactions as a potential therapeutic target in allergic inflammation and asthma. *Front Med*. 2017; 4:129.
41. Théorêt J-F, Yacoub D, Hachem A, Gillis M-A, Merhi Y. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thromb Res*. 2011; 128:243–250.
42. Miedzobrodzki J, Panz T, Płonka PM, Zajac K, Dracz J, Pytel K, Mateuszuk L, Chłopicki S. Platelets augment respiratory burst in neutrophils activated by selected species of gram-positive or gram-negative bacteria. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2008, 46(3), 383-388.
43. Kroczek RA, Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998; 391:591–594.
44. Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, Sorge R, Violi F. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45:35–42.
45. Déchanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoche J, Moreau JF. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol*. 1997; 159:5640–5647.
46. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med*. 1991; 174:785–790.
47. Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR Jr. Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med*. 2005; 3:37.
48. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001; 103:1772–1777.
49. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1512–1518.
50. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AEI, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005; 105:924–930.
51. Alard J-E, Ortega-Gomez A, Wichapong K, Bongiovanni D, Horckmans M, Megens RT, Leoni G, Ferraro B, Rossaint J, Paulin N, Ng J, Ippel H, Suyleb D, Hinkel R, Blanchet R, Gaillard F, D'Amico M, von Hundelshausen P, Zarbock A, Scheiermann C, Hackeng TM, Steffens S, Kupatt C, Nicolaes GA, Weber C, Soehnlein O. Recruitment of classical

- monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5. *Sci Transl Med.* 2015; 7:317ra196.
52. Durack DT. Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. *J Pathol.* 1975; 115: 81–89.
 53. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4: 445–457.
 54. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 2008; 111(3):981-986.
 55. Yeaman M, Bayer AS. Antimicrobial Host Defense. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* San Diego: Elsevier Science. 2007. pp 469–490.
 56. Yeaman MR, Puentes SM, Norman DC, Bayer AS. Partial characterization and staphylocidal activity of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infect Immun.* 1992. 60: 1202–1209.
 57. Yeaman MR, Tang YQ, Shen AJ, Bayer AS, Selsted ME. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun.* 1997. 65: 1023–1031.
 58. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002. 70: 6524–6533.
 59. Koo SP, Yeaman MR, Nast CC, Bayer AS. The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infect Immun.* 1997; 65:4795–4800.
 60. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, Brandt E, Ehlert JE, Kuijpers AJ, Engbers GH, Feijen J, Dankert J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *Journal of Biological Chemistry.* 2000. 275(27), 20374-20381.
 61. Yeaman MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol* 2010; 5:471-506.
 62. Schaffner A, King CC, Schaer D, Guiney DG. Induction and antimicrobial activity of platelet basic protein derivatives in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2004; 76:1010-1018.
 63. Lorenz R, Brauer M. Platelet factor 4 (PF4) in septicaemia. *Infection.* 1988; 16:273-276.
 64. Essien EM, Ebhota MI. Platelet secretory activities in acute malaria (*Plasmodium falciparum*) infection. *Acta Haematol,* 1983; 70:183-188.
 65. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, Brandt E, Ehlert JE, Kuijpers AJ, Engbers GH, Feijen J, Dankert J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:20374–20381.
 66. Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals.* 2014; 7(5):545-594.
 67. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WH, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.* 2011; 7:e1002355.
 68. Burkhardt, JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012; 120(15):e73-82.
 69. Valle X, Ramírez A, Aquino AS, Sánchez F, Bustos J, Romero MDLÁ, Torres H, Serafín J, Aguilar SR. Human platelets and megakaryocytes express defensin alpha 1. *Platelets.* 2020; 31(3):344-354.
 70. Arnlijots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia.* 1998; 12:1789–1795.

71. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000; 96:3086–3093.
72. Lehrer RI, Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunological reviews*. 2012. 245(1), 84-112.
73. Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*. 1985; 76:1436-1439.
74. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*. 1989; 84:553–561.
75. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunological reviews*. 2000; 177:68-78.
76. Guo CJ, Tan N, Song L, Douglas SD, Ho WZ. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS (London, England)*. 2004; 18(8), 1217-1218.
77. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology*. 1986; 60(3), 1068-1074.
78. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL, Stenger S. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol*. 2006; 177:1864–1871.
79. Burnett RJ, Lyden CA, Tindal CJ, Cave CM, Marra MN, Solomkin JS. Mononuclear cell line THP-1 internalizes bactericidal/permeability-increasing protein by a non-receptor-mediated mechanism consistent with pinocytosis. *Arch Surg*. 1996; 131:200–205.
80. Ballmaier M, Holter W, Germeshausen M. Flow cytometric detection of MPL (CD110) as a diagnostic tool for differentiation of congenital thrombocytopenias. *Haematologica*. 2015; 100(9):e341-44.
81. Chen J, Herceg-Harjacek L, Groopman JE, Grabarek J. Regulation of platelet activation in vitro by the c-Mpl ligand, thrombopoietin. *Blood*. 1995 Dec 1; 86(11):4054-4062.
82. de Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *The Journal of the American Society of Hematology*. 2002; 100(4), 1310-1317.
83. Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *The Journal of cell biology*. 2003; 160(4), 577-587.
84. White MJ, Schoenwaelder SM, Josefsson EC, Jarman KE, Henley KJ, James C, Debrincat MA, Jackson SP, Huang DCS, Kile BT. Caspase-9 mediates the apoptotic death of megakaryocytes and platelets, but is dispensable for their generation and function. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012; 119(18), 4283-4290.
85. Raque VX, Carlos SJ, Eduardo RR, Rafael BH, Ángeles RML, Adriana RC, Honorio TA, José BA, Roberto AS. Modification of immunological features in human platelets during sepsis. *Immunol Invest*. 2018; 47(2):196-211.
86. Ståhl AL, Svensson M, Mörgelin M, Svanborg C, Tarr PI, Mooney JC, Watkins SL, Johnson R, Karpman D. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2006 Jul 1; 108(1):167-176.
87. Wang YQ, Wang B, Liang Y, Cao SH, Liu L, Xu XN. Role of platelet TLR4 expression in pathogenesis of septic thrombocytopenia. *World J Emerg Med*. 2011; 2(1):13-17.

88. Watson CN, Kerrigan SW, Cox D, Henderson IR, Watson SP, Arman M. Human platelet activation by *Escherichia coli*: roles for FcγRIIA and integrin αIIbβ3. *Platelets*. 2016; 27(6):535-540.
89. Yount NY, Gank KD, Xiong YQ, Bayer AS, Pender T, Welch WH, Yeaman MR. Platelet microbicidal protein 1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(11):4395-4404.
90. Tohidnezhad M, Varoga D, Podschun R, Wruck CJ, Seekamp A, Brandenburg LO, Pufe T, Lippross S. Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3. *Injury*. 2011; 42(7):682-686.
91. López-Bermejo A, Chico-Julia B, Castro A, Recasens M, Esteve E, Biarnés J, Casamitjana R, Ricart W, Fernández-Real JM. Alpha defensins 1, 2, and 3: potential roles in dyslipidemia and vascular dysfunction in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007; 27(5), 1166-1171.
92. Quinn KL, Henriques M, Tabuchi A, Han B, Yang H, Cheng WE, Tole S, Yu H, Luo A, Charbonney E, Tullis E, Lazarus A, Robinson LA, Ni H, Peterson BR, Kuebler WM, Slutsky AS, Zhang H. Human neutrophil peptides mediate endothelial-monocyte interaction, foam cell formation, and platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011. Sep; 31(9):2070-2079.
93. Horn M, Bertling A, Brodde MF, Müller A, Roth J, Van Aken H, Jurk K, Heilmann C, Peters G, Kehrel BE. Human neutrophil alpha-defensins induce formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(4):647-661.
94. Glenthøj A, Glenthøj AJ, Borregaard N. Pro HNP s are the principal α-defensins of human plasma. *European journal of clinical investigation*. 2013; 43(8), 836-843.
95. Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Gray M. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α-defensins. *The Journal of Immunology*. 2009; 183(3), 2122-2132.
96. Brook M, Tomlinson GH, Miles K, Smith RW, Rossi AG, Hiemstra PS, van't Wout EFA, Dean JLE, Gray NK, Lu W, Gray M. Neutrophil-derived alpha defensins control inflammation by inhibiting macrophage mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(16), 4350-4355.
97. Droin N, Jacquelin A, Hendra JB, Racoer C, Truntzer C, Pecqueur D, Benikhlef N, Ciudad M, Guery L, Jooste V, Dufour E, Feneaux P, Quesnel B, Kosmider O, Fontenay M, Ducoroy P, Solary E. Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010; 115:78–88.
98. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, Nakauchi H, Arai F, Fukuda T, Eto K. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Experimental hematology*. 2013, 41(8), 742-748.
99. Lei XH, Yang YQ, Ma CY, Duan EK. Induction of differentiation of human stem cells ex vivo: Toward large-scale platelet production. *World Journal of Stem Cells*. 2019, 11(9), 666-676.
100. Varkey J, Nagaraj R. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. 49(11), 4561-4566.
101. Auerbach DJ, Lin Y, Miao H, Cimbro R, Difiore MJ, Gianolini ME, Furci L, Biswas P, Fauci AS, Lusso P. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 9569–9574.

102. Solomon Tsegaye T, Gnirss K, Rahe-Meyer N, Kiene M, Kramer-Kuhl A, Behrens G, Münch J, Pöhlmann S. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells. *Retrovirology*. 2013; 10(1), 48.
103. Assinger, A. Platelets and infection—an emerging role of platelets in viral infection. *Frontiers in immunology*. 2014; 5, 649.
104. Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of α -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115(3), 765-773.
105. Durandt C, Potgieter JC, Khoosal R, Nel JG, Herd CL, Mellet J, Herd C, Khoosal R, Nel JG, Rossouw T, Pepper MS. HIV and haematopoiesis. *South African Medical Journal*. 2019; 109(8b), 40-45.

ANEXO II. Carta de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y fecha: _____

Por medio de la presente, C. _____

Autorizo mi participación en el protocolo de investigación titulado:

“Identificación de nuevos ARNs mensajeros asociados a la respuesta inmune en las plaquetas de pacientes con sepsis”

Aprobado por el comité de ética del Hospital General de Zona 1, cuyo objetivo es identificar nuevos ARNs mensajeros asociados a la respuesta inmune. Los resultados obtenidos a través de este proyecto podrían ayudar a la generación de nuevo conocimiento y a encontrar nuevas funciones en la respuesta inmunológica por parte de las plaquetas.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en autorizar la toma de una muestra de 10 ml de sangre para la obtención de suero y plaquetas.

Declaro que se me ha informado que el proyecto es una investigación de riesgo mínimo debido a que se requiere de una punción para la obtención de la muestra sanguínea, sin embargo, no conlleva ningún tipo de riesgo significativo para mi salud ni para mi vida.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento, en que lo considere conveniente.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del responsable.

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.

Testigos:

Nombre y firma

Nombre y firma



Human platelets and megakaryocytes express defensin alpha 1

Xareni Valle-Jiménez^{1,2}, Adriana Ramírez-Cosmes², Alba Soledad Aquino-Domínguez², Francisco Sánchez-Peña², José Bustos-Arriaga³, María De Los Ángeles Romero-Tlalolini⁴, Honorio Torres-Aguilar⁵, Jeanet Serafin-López¹, & Sergio Roberto Aguilar Ruíz²

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), ENCB-IPN, Ciudad de México, México, ²Departamento de Biomedicina Experimental, Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Oaxaca, México, ³Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de Arbovirus, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores - Iztacala de la Universidad Autónoma Nacional de México, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México, ⁴CONACYT- Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Oaxaca, Facultad de Medicina y Cirugía, México, and ⁵Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Oaxaca, México

Abstract

Platelets are anucleate cells that have a role in several innate immune functions, including the secretion of proteins with antimicrobial activity. Several studies have demonstrated the ability of platelets to secrete thrombin-induced platelet microbicidal proteins and antimicrobial peptides, like hBD-1. However, the expression and secretion of defensins of the alpha family by platelets have not been fully elucidated. The aim of this study was to characterize the expression of defensin alpha 1 (DEFA1) in human platelets and megakaryocytes. Our data indicate that DEFA1 mRNA and protein are present in peripheral blood platelets and in the megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01). DEFA1 co-localize with α -granules of platelets and MEG-01 cells, and was also detected in cytoplasm of MEG-01 cells. The assay of our *in vitro* model of platelet-like particles (PLPs) revealed that MEG-01 cells could transfer DEFA1 mRNA to their differentiated PLPs. Furthermore, platelets secreted DEFA1 into the culture medium when activated with thrombin, adenosine diphosphate, and lipopolysaccharide; meanwhile, MEG-01 cells secreted DEFA1 when activated with thrombopoietin. Platelet's secreted DEFA1 can rebind to platelet's surface and have antibacterial activity against the gram-negative bacteria *Escherichia coli*. In summary, our data indicate that both, human platelets and megakaryocytes, can express and secrete DEFA1. These results suggest a new role of platelets and megakaryocytes in the innate immune response.

Keywords

Antimicrobial peptide, defensin alpha 1, human neutrophil peptide, immunity innate, megakaryocyte, platelet

History

Received 2 January 2019
Revised 19 April 2019
Accepted 29 April 2019
Published online 22 May 2019

Introduction

Platelets are anucleate cells derived from megakaryocytes in the bone marrow. Many platelet functions result from their ability to store a large number of biologically active molecules in intracellular granules; these molecules are secreted when platelets get activated by thrombin, adenosine diphosphate (ADP), collagen, and pathogens [1]. However, in addition to storing bioactive molecules, platelets can also synthesize them. Recent evidence suggests that platelets contain a large amount of messenger RNA (mRNA) that is stored during their formation. In addition, platelets contain all the translational machinery necessary to synthesize proteins during hemostatic and inflammatory processes [2,3]. The platelet synthesis of proteins with immunological functions suggests the existence of an unexplored role of these cells in the immune response [4].

It is well known that bacteria induce platelet activation both directly and indirectly [5]. Furthermore, recent evidence indicates

that platelets can also modulate bacterial activity by secreting antimicrobial proteins. These proteins are collectively known as platelet microbicidal proteins (PMPs) and include chemokines, fibrinopeptides, and thymosin β -4 [6]. Platelets transport PMPs to infection sites, where they have direct antimicrobial effects and potentiate the antimicrobial action of leukocytes [7–10]. Previous studies have shown that rabbit platelets contain several cationic PMPs, including proteins that exhibit *in vitro* activity against *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans* [9], as well as thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 (tPMP-1), which kills *S. aureus* [11]. Another study identified a group of antimicrobial proteins designated thrombocydins (TC), including TC-1 and TC-2, which were active against *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, and *Lactococcus lactis* [12]. These TCs did not lyse the bacterial cell membrane, indicating that their mechanism of action is different from that of tPMP-1; however, such mechanism has not been elucidated to date.

Recent findings indicate that PMPs are not the only proteins with antimicrobial activity in platelets. Another important group of active proteins is antimicrobial peptides (AMPs); peptides from 10 to 150 amino acids of which approximately 60% are positively charged. AMPs are stored in cells as propeptides or mature peptides, and when secreted not only lyse bacteria, but also induce apoptosis in target cells, regenerate tissues, and modulate the

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/iplt.

Correspondence: Sergio Aguilar Ruíz, Departamento de Biomedicina Experimental, Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad Autónoma 'Benito Juárez' of Oaxaca, Av. San Felipe del Agua s/n. C. P. 68120 Oaxaca, Oaxaca, México. E-mail: sar_cinvestav@hotmail.com