

## EL EDTA INDUCE UN ESTADO DE PREACTIVACIÓN EN LAS PLAQUETAS CON CAMBIOS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Brunso L<sup>a</sup>, Arderiu G<sup>a</sup>, Navalón F<sup>a</sup>, Pino M<sup>a</sup>, Diaz-Ricart M<sup>a</sup>, White JG<sup>b</sup>, Escolar G<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hemoterapia-Hemostasia, Hospital Clinic, CDB, IDIBAPS, UB, Barcelona. <sup>b</sup> University Minnesota Medical School, Lab Medicine-Pathology, MN, USA.

**Fundamentos:** El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un anticoagulante de uso frecuente en el laboratorio de hematología. Aunque no es adecuado para estudios de funcionalismo plaquetario, se utiliza para prevenir la formación de agregados y facilitar el estudio de cambios mediante citometría de flujo. Estudios recientes sugieren que podría tener un efecto deletéreo sobre las plaquetas.

**Objetivos:** Evaluar el efecto del EDTA sobre las plaquetas a nivel de receptores, mecanismos de señalización y el ensamblaje del citoesqueleto.

**Métodos:** Muestras de sangre o suspensiones de plaquetas fueron incubadas con EDTA (5mM, 22°C, 24h). Cambios en la morfología y la presencia de marcadores de activación fueron evaluados mediante técnicas ultraestructurales y citometría de flujo. Suspensiones de plaquetas, en presencia de Ca<sup>2+</sup> o expuestas a EDTA, también fueron activadas con trombina (0.5U/ml, 90s). El análisis proteico de los lisados y del citoesqueleto fue realizado por electroforesis en geles de acrilamida (8%) y tinción con azul de Coomassie. Las fosfotirosín-proteínas fueron detectadas tras transferencia proteica y quimioluminiscencia. Los efectos de wortmanina (1#mM, inhibidor de PI3K) y tirfostin47 (50 #mM, inhibidor de tirosín-quinasa) fueron evaluados.

**Resultados:** La incubación prolongada de sangre o suspensiones de plaquetas en EDTA indujo un incremento progresivo en la expresión de P-selectina y depleción de los gránulos. La presencia de EDTA resultó en un aumento en la fosforilación de proteínas, compatible con un estado de preactivación, y una disminución significativa en la fosforilación de la proteína constitucional pp62<sup>yes</sup>, con mínimo impacto sobre el ensamblaje del citoesqueleto. La activación con trombina no restauró la fosforilación de pp62<sup>yes</sup>, aunque sí indujo la polimerización de actina y la asociación de otras proteínas contráctiles con patrones que diferían de los observados en presencia de Ca<sup>2+</sup>. Wortmanina y tirfostin47 previnieron las alteraciones inducidas por EDTA e inhibieron los mecanismos de señalización y del ensamblaje del citoesqueleto inducidos por trombina.

**Conclusiones:** El EDTA tiene un efecto deletéreo sobre las plaquetas. Provoca degranulación, induce cambios en mecanismos de señalización e interfiere aunque mínimamente con la asociación de proteínas del citoesqueleto. Estos efectos son más evidentes con el tiempo de exposición. El EDTA favorecería la fusión de los gránulos con el sistema canalicular abierto y un estado de preactivación plaquetaria que puede interferir con la respuesta a otros agonistas.