

Tesis de Licenciatura

Efecto de la trombopoyetina y del factor estimulador de colonias granulocíticas en plaquetas y leucocitos polimorfonucleares

Pozner, Roberto Gabriel

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pozner, Roberto Gabriel. (). Efecto de la trombopoyetina y del factor estimulador de colonias granulocíticas en plaquetas y leucocitos polimorfonucleares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000657_Pozner

Cita tipo Chicago:

Pozner, Roberto Gabriel. "Efecto de la trombopoyetina y del factor estimulador de colonias granulocíticas en plaquetas y leucocitos polimorfonucleares". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000657_Pozner

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

Seminario

de

Licenciatura

Efecto de la trombopoyetina y del factor estimulador de
colonias granulocíticas en plaquetas y leucocitos
polimorfonucleares

Alumno: **Roberto Gabriel Pozner.**

Libreta Universitaria: **364/90.**

Directora: **Dra. Mirta Ana Schattner.**

Lugar de Trabajo: **Dept. de Hemostasia y Trombosis.**

Instituto de Investigaciones Hematológicas.

Academia Nacional de Medicina.

Año: **1999.**

Nº 06574

INDICE

abreviaturas.	3
agradecimientos.	4
introducción:	
hematopoyesis.	5
trombopoyetina.	7
plaquetas.	11
factor estimulador de colonias granulocíticas.	16
leucocitos polimorfonucleares.	18
interacción entre plaquetas y leucocitos polimorfonucleares.	21
objetivo:	23
materiales y métodos:	24
resultados:	
efecto de la TPO y G-CSF en agregación de plaquetas y liberación de ATP intraplaquetario.	30
efecto de la TPO y G-CSF sobre la expresión GPIb y selectina-P.	33
efecto de la TPO y G-CSF sobre la expresión de CD11b en leucocitos polimorfonucleares.	37
efecto de la TPO y G-CSF sobre la formación de agregados entre plaquetas y leucocitos polimorfonucleares.	38
discusión:	40
publicaciones parciales:	43
referencias bibliográficas:	44

ABREVIATURAS:

ADP: adenosina difosfato.	MGDF: factor del desarrollo y crecimiento megacariocítico.
AMPc: adenosina monofosfato cíclica.	Mkp: megacariocitopoyesis.
ATP: adenosina trifosfato.	Mks: megacariocitos.
CMP: célula madre pluripotencial.	MoAbs: anticuerpos monoclonales.
c-mpl: proto-onco gen celular (c-mpl) responsable de la transformación de células hematopoyéticas.	Mpl-L: ligando para Mpl.
CSF3R: receptor humano del G-CSF.	NAP: péptido activador de neutrófilos.
DAG: diacilglicerol.	PAF: factor activador de plaquetas.
DO: densidad óptica.	PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
fMLP: péptido formilado metionil-leucil-fenilalanina.	PE: ficoeritrina.
EPO: eritropoyetina.	PEG-rHuMGDF: factor del desarrollo y crecimiento megacariocítico recombinante humano polietilenglicado.
Fg: fibrinógeno.	PF: paraformaldehído.
FITC: isotiocianato de fluoresceína.	PLC: fosfolipasa C.
FL: fluorescencia.	PMN: leucocitos polimorfonucleares.
FvW: factor von Willebrand.	PRP: plasma rico en plaquetas.
G-CSF: factor de estimulación de colonias granulocíticas.	R: Región.
GP: glicoproteína.	rHu: recombinante humana.
IL: Interleuquina.	SCF: factor de CMP.
IP3: inositol trifosfato.	TA: Temperatura ambiente.
Kb: kilobases.	TPO: trombopoyetina.
LL: luciferin luciferasa.	TxA₂: tromboxano A ₂ .
LT: leucotrienos.	v-mpl: oncogen viral responsable de la transformación de células hematopoyéticas.
M: margen.	

AGRADECIMIENTOS:

- A mi generosa Directora de Beca, la Dra. Schattner, aunque en esta ocasión es Mirta, que me brindó todo el tiempo del mundo y me dio la oportunidad de iniciarme en esta gran aventura de hacer ciencia, siempre con sus oídos abiertos a mis inquietudes, sus palabras ante mis angustias, sus enseñanzas, su paciencia y dedicación y su cariño. Hago extensivo y no menos importante este agradecimiento a Ricardo, Andrés y Nicolás que sufrieron mis frecuentes llamados telefónicos sin quejarse.
- A la Dra. Lazzari, quien me aceptó en su laboratorio y empujó siempre hacia adelante para que hoy esté finalizando mi carrera. Los moretones debidos a estos empujones no están incluidos en el agradecimiento.
- A Mariana por conectarme con la Academia. A Alejandra por los ratos compartidos en el laboratorio y por Física II, también a Gabriela y Fernando.
- A Norma y la puerta cerrada, Carlitos, Susana, Fabiana, Emilse, Adriana, Analía, Patricia, Laura y a Gladys con sus infusiones.
- A mis queridos vecinos de sección Caty, Cristina, Rosario, Gonzalo y la Señora de Bioquímica Rosa. A la gente de inmuno.
- A este alejado, querido e inolvidable Pabellón 2 de Ciudad Universitaria.
- A Luis y Cecilia que me bancaron 28 años de locura, desorden, pasión y hoy están conmigo (aunque en otra casa). A Mariel con sus preguntas y sus respuestas y su sonrisa alentadora.
- A la Baba por soñar conmigo en este proyecto y por acertar siempre las notas que me voy a sacar.
- A Benja, Graciela, Martín y Mariana (junto con Marito) por esos invalables asados de Domingo y ser mi segunda familia.
- A Negri por su apoyo moral, espiritual y alimenticio. Por alentarme siempre. Por ser mi suegra.
- A los chicos del grupo de YMCA que siempre me bancan. A los Fernandez que compartieron esta última parte de la facu palmo a palmo.
- A mis amigos del laboratorio, especialmente Ale y Lore que ya son expertos en megacariocitopoyesis y otras yerbas.
- A los que no están físicamente pero que siempre me acompañaron y acompañarán.
- Finalmente se lo dedico a la persona que me enseñó que todo es posible, si se desea plenamente y que culminar los proyectos viene de la mano de una infinita felicidad. Para la que me permite despertar esa pequeña ilusión de volver a casa para reencontrarnos todos los días, por el resto de los días. A Laura, mi esposa, gracias por estar siempre a mi lado (incluso sin dormir).

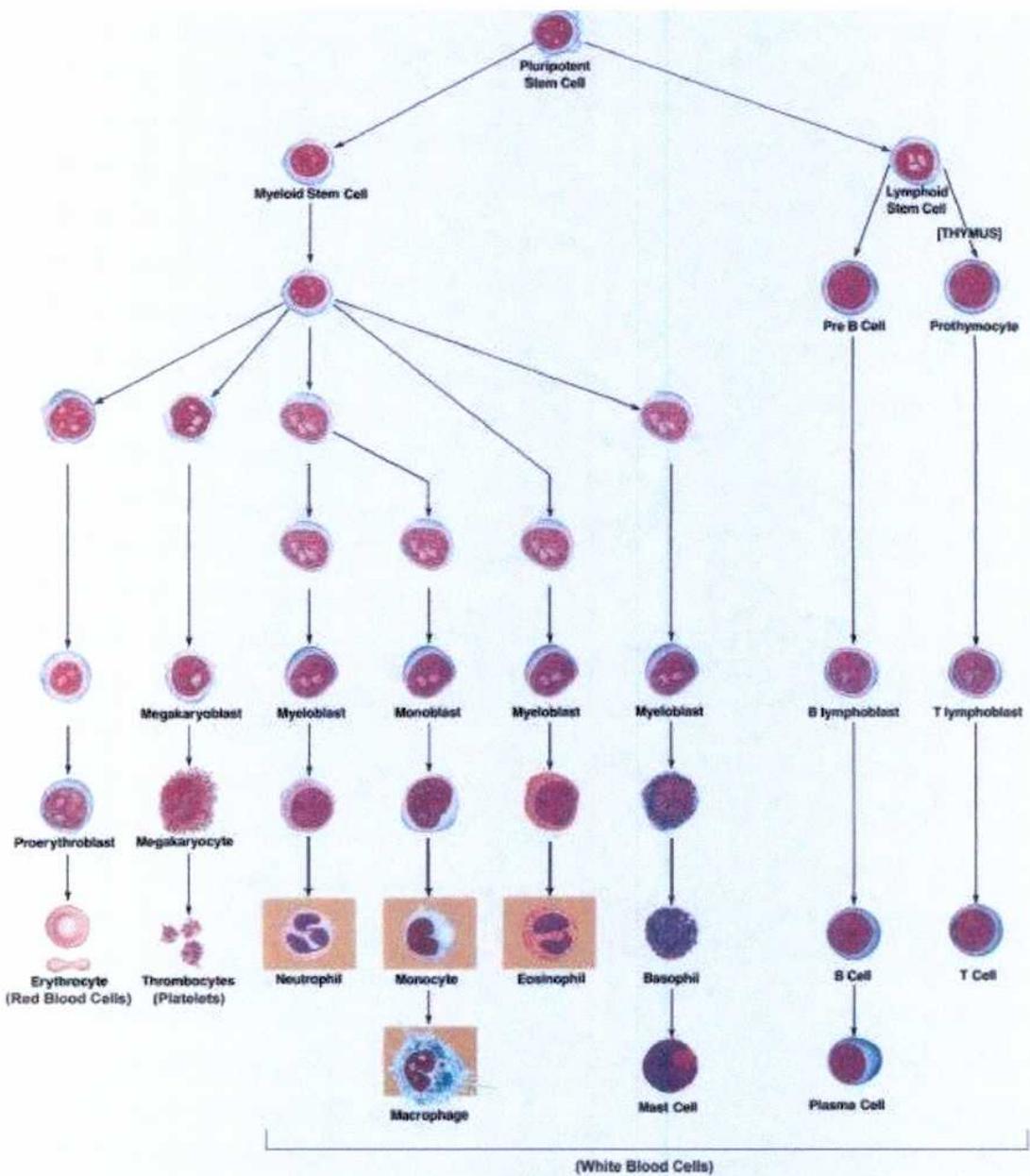
EFECTO DE LA TROMBOPOYETINA Y DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS GRANULOCITICAS EN PLAQUETAS Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

INTRODUCCION

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis consiste en la formación y desarrollo de células sanguíneas a partir de la célula madre pluripotencial (CMP). Las células hematopoyéticas requieren factores de crecimiento para su supervivencia, multiplicación, diferenciación y maduración. La hematopoyesis se mantiene durante toda la vida del individuo de modo que el número de células nuevas equilibra al de células que se pierden o mueren. El cuerpo humano produce unos 400.000 millones de células sanguíneas cada día. El nivel de células sanguíneas es controlado por múltiples factores humorales y celulares que deben ser necesarios se ajustan rápidamente. Las infecciones dan como resultado casi inmediato la liberación de neutrófilos maduros desde los reservorios medulares seguido de un incremento en la producción de granulocitos y usualmente también monocitos, hasta que el agente infeccioso sea eliminado. La hemorragia o la hemólisis aguda promueven una rápida respuesta medular liberando reticulocitos seguido de un aumento sostenido en la producción de glóbulos rojos hasta normalizar su número. La producción y liberación de plaquetas responde a varios estímulos incluyendo la disminución en el número de plaquetas, anemias agudas y destrucción de tejidos o inflamación. La modulación de la producción de células B y T es compleja y aparece en respuesta a un estímulo inmune.

Los diferentes tipos de células maduras son la culminación de la maduración de las CMP, la cual se diferencia hacia los progenitores celulares bajo el control de citoquinas circulantes o unidas a la membrana (1).



Esquema de la Hematopoyesis.

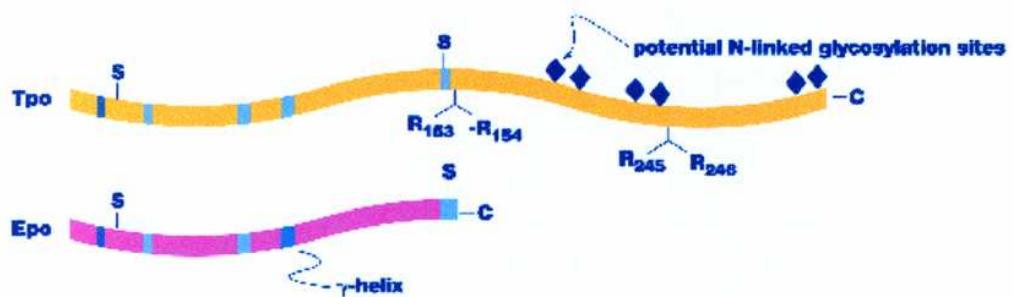
TROMBOPOYETINA

Clonado y caracterización de la Trombopoyetina

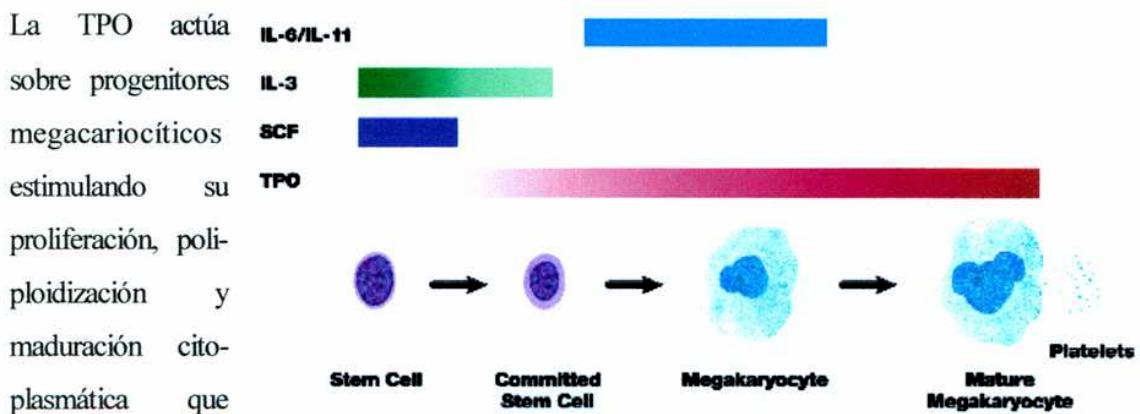
Históricamente los estudios sobre la regulación de la megacariocitopoyesis (Mkp) eran dominados en su mayor parte por el concepto de regulación humoral. El término trombopoyetina (TPO) fue usado por primera vez en 1958 para describir la sustancia humoral responsable de la producción de plaquetas aumentada después del inicio de la trombocitopenia (2). A pesar de 35 años de trabajo, el factor responsable de estos efectos no podía aislarse. El clonado exitoso de la TPO comenzó con la identificación de un retrovirus de ratón, llamado MPL-V, basado en la leucemia mieloproliferativa que inducía (3). El oncogen viral (*v-mpl*) responsable de la transformación de células hematopoyéticas multipotenciales y progenitores fue rápidamente aislado. Al poco tiempo se aisló su homólogo celular (*c-mpl*) obtenido a partir de una línea celular humana de una eritroleucemia, HEL (4). Datos de la secuencia primaria de ambos genes sugirieron que el polipéptido normal debía funcionar como receptor para factores de crecimiento hematopoyéticos. Resultados obtenidos en las 18 meses siguientes arrojaron fuertes evidencias de que el ligando de este receptor debía estar involucrado en el desarrollo de los megacariocitos (Mks). Entre ellos cabe citar que las células HEL, de donde se había aislado el *c-mpl*, podían diferenciarse tanto en líneas eritroides como megacariocíticas (5); la expresión del *c-mpl* era limitada a poblaciones normales que incluían Mks, sus precursores o su progenie y la eliminación de la expresión del *c-mpl* en células CD34⁺ daba como resultado la eliminación selectiva de colonias formadoras de Mks (6). De esta manera y utilizando estrategias diferentes, el ligando del *c-mpl* fue aislado simultáneamente por cuatro grupos independientes (7-10). La proteína purificada se llamó Mpl-L (Ligando para Mpl), factor del desarrollo y crecimiento megacariocítico (MGDF) o TPO.

El gen de la TPO se localiza en el cromosoma 3q26-q27 y codifica para un polipéptido de 353 aa (11). Basado en su homología con la eritropoyetina (EPO) se la puede considerar como una proteína que tiene dos dominios: uno amino terminal y el otro carboxilo terminal. Los 155 residuos amino-terminales tienen 46% de homología estructural con la EPO. El extremo amino terminal es el que se une al *c-mpl* (8). Los 177

residuos del dominio carboxilo terminal no presentan homología con ninguna proteína conocida. Esta región contiene múltiples residuos asociados a carbohidratos. Si bien la delección de esta región no afecta la actividad de la proteína in-vitro, disminuye sustancialmente su biodisponibilidad in-vivo (12).



Actividades biológicas de la TPO



conduce hacia la producción de plaquetas (7,8,13). Es un potente factor estimulador de colonias de Mks y actúa en sinergismo con IL-3, IL-11, Factor de CMP (SCF) y EPO que también modulan el crecimiento de los Mks. (13-15). La TPO es el factor de crecimiento más potente para el linaje megacariocítico. Sin embargo, una combinación de citoquinas tales como el SCF, IL-3 e IL-6 puede reemplazar los efectos de la TPO a nivel de la proliferación de progenitores megacariocíticos in-vitro (16). Claras evidencias que la TPO es el regulador homeostático de la producción de plaquetas han sido provistas por los experimentos de ratones con una delección (knock-out) para el c-mpl o para la TPO que presentaban trombocitopenias severas pero no letales (17,18).

La TPO al igual que otros factores de crecimiento tiene un amplio rango de actividades biológicas además de su función principal como



regulador de la Mkp. Aunque la TPO no es activa por sí misma, es capaz de gatillar la agregación plaquetaria, la liberación de 5-hidroxitriptamina y la formación de Tromboxano B2 inducida por otros agonistas plaquetarios (19,20). Induce la fosforilación de restos tirosínicos de varias proteínas celulares incluyendo su propio receptor (20,21). También se ha demostrado que la TPO estimula la unión del fibrinógeno (Fg) a plaquetas y el pegado de las mismas al colágeno (22). Estudios en ratones tratados con TPO mostraron que los gránulos α de las plaquetas presentaban pequeños incrementos en la fibronectina y la selectina-P sin aumentar ninguna otra proteína de los gránulos (23). Recientemente se ha demostrado que la TPO también es capaz de regular la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) por una interacción específica con el receptor expresado en la superficie de estas células (24).

La TPO es producida constitutivamente por el hígado y el riñón (7,9). Circula por el torrente sanguíneo y se deposita en la médula ósea donde estimula principalmente la Mkp. Los niveles plasmáticos de TPO son regulados por la masa de c-mpl plaquetario y megacariocítico ya que la unión entre la TPO y su receptor da como resultado la internalización y degradación de la citoquina (25,26). La sobrevida de la TPO en circulación es mayor que la de cualquier otro factor de crecimiento. Su vida media es aproximadamente de 30 horas (27).

Receptor de la trombopoyetina, c-mpl. Señales de transducción.

El receptor c-mpl es un miembro de la superfamilia de receptores hematopoyéticos que carece de actividad quinasa intrínseca. Se expresa en células CD34 $^{+}$, progenitores de Mks, plaquetas, células endoteliales y PMN (28). La unión a su ligando induce su homodimerización y la mayoría de los eventos de señalización para la proliferación son mediados a través del patrón de JAK2/STAT5, mientras que la diferenciación puede ocurrir mediante la activación prolongada de la vía MAP K (29). El receptor para TPO expresado

en la superficie plaquetaria es similar al de los Mks. Su masa molecular es de aproximadamente 80 kDa. En los Mks aparece una única clase de receptor de alta afinidad pero el número de receptores por célula varía según el estado de maduración de las mismas. A medida que este avanza, la cantidad de receptores por célula aumenta. Por ejemplo en Mks derivados de progenitores aislados en sangre periférica hay 1933 ± 772 receptores por célula mientras que en Mks derivados de progenitores aislados en sangre de cordón umbilical hay 184 ± 48 (30). Además, su expresión es independiente de la concentración de TPO (31).

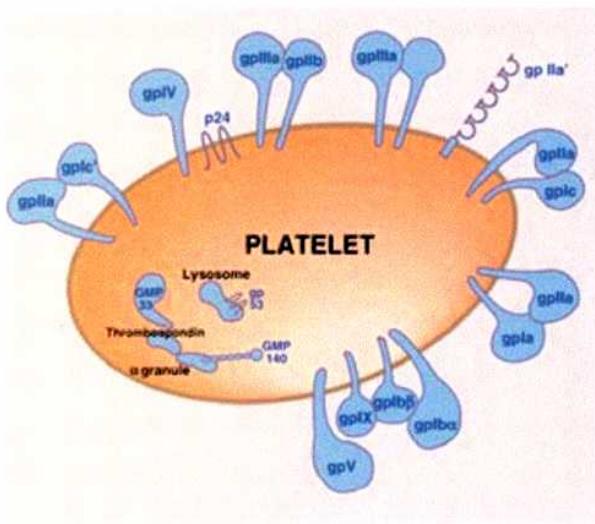
Ensayos Clínicos con Trombopoyetina.

Desde el descubrimiento de la TPO, hace cinco años, ha habido mucho interés en el uso clínico de este factor de crecimiento y su impacto sobre transfusiones de plaquetas. Dos moléculas de TPO recombinante humana (rHU) están actualmente bajo investigación clínica intensiva. Una es la TPO glicosilada de tamaño normal (rHuTPO) y la otra es una TPO truncada no glicosilada que contiene solo la región de unión al receptor químicamente modificada por el agregado de polietilenglicol (PEG-rHuMGDF), que le aumenta la vida media de la molécula (12). Ambos se unen al receptor de TPO (c-mpl), y estimulan el crecimiento de Mks y la producción de plaquetas in-vitro e in-vivo (32). Sin embargo, comparaciones directas entre ellas aún no se han realizado. En todos los estudios la administración de ambas formas de TPO ha sido segura y cuando fueron administradas antes de la quimioterapia resultaron en una profunda estimulación de la producción de plaquetas. Las conclusiones de estos ensayos son:

La TPO es efectiva en acelerar la recuperación de plaquetas a niveles basales después de dosis convencionales de quimioterapia en pacientes con cáncer y después de transplante de médula ósea en pacientes con cáncer de mama (33).

Su uso en dadores normales de plaquetas mejora el rendimiento de plaquetas y produce incrementos más altos en el recuento de plaquetas después de la transfusión en personas con trombocitopenia (34).

PLAQUETAS



Son células anucleadas, que derivan de la fragmentación de los Mks. Las plaquetas tienen forma discoide y un diámetro de 2 a 4 μm . Su vida media aproximada es de 10 días. Están involucradas en distintos procesos fisiológicos y patológicos. Uno de los más importantes es la formación del tapón hemostático en procesos de lesión vascular (35).

La pérdida de integridad en el endotelio vascular representa un estímulo de activación para las plaquetas que son capaces de responder con cuatro tipos de respuestas diferentes: el cambio de forma, adhesividad, agregación y liberación; que se produzca una o todas depende del grado de estimulación de las células.

- **Cambio de forma**

Cuando las plaquetas reaccionan sufren diversos cambios morfológicos y bioquímicos. El primero de ellos es el cambio de forma discoide a esférica junto con la emisión de pseudópodos que permiten una mayor exposición de los receptores de superficie favoreciendo la adhesión de la plaqueta a las estructuras subendoteliales (36).

- **Adhesividad**

Se define como adhesividad al proceso por el cual una célula se une a alguna superficie. Existen tres tipos de procesos adhesivos:

Adhesión a una superficie no celular.

Es el proceso a través del cual las plaquetas se unen al subendotelio durante la primera fase de la formación del tapón hemostático después de la injuria endotelial. El contacto inicial de las plaquetas con el subendotelio es dependiente del complejo glicoproteico GPIb-IX. Es la sialoglicoproteína más abundante de la superficie plaquetaria. Hay aproximadamente 25.000 copias en cada plaqueta. La GPIb consiste de dos subunidades GPIb α ($Mr=145.000$) y GPIb β ($Mr=24.000$) unidas por puentes disulfuro y además está fuertemente acompañada con la GPIX ($Mr=17.000$)(37). La función del complejo GPIb-IX es permitir la adhesión de las plaquetas al factor von Willebrand (FvW), (proteína adhesiva) del subendotelio (38). Las plaquetas circulantes no activadas, no unen el FvW soluble presente en sangre aunque sí se adhieren al FvW inmovilizado en el subendotelio. Se cree que cuando el FvW está inmovilizado asume una conformación a la cual se puede unir el complejo GPIb-IX de la plaqueta (39). Luego del contacto con el subendotelio, el siguiente paso de la adhesión de las plaquetas es el estiramiento de las mismas que se produce por la interacción entre el FvW del subendotelio y la GPIIbIIIa de la plaqueta (40). Otros componentes de la matriz extracelular que intervienen, aunque en menor grado, en la adhesividad de las plaquetas al subendotelio son el colágeno, la fibronectina y la laminina que se unen a receptores específicos en la membrana plaquetaria.

Adhesión célula-célula heteróloga.

Se refiere a que las dos o más células que participan en el proceso son diferentes. Un ejemplo de este tipo de interacción es la adhesión de las plaquetas a los monocitos y/o a los PMN (41).

Adhesión célula-célula homóloga.

En este caso las células participantes son del mismo tipo. Es el fenómeno conocido como agregación y en el cual una plaqueta se une a otra formando agregados que van a formar el trombo plaquetario.

• Agregación

La unión entre plaqueta-plaqueta es mediada por el complejo glicoproteico IIbIIIa y el Fg. El complejo GPIIbIIIa es la glicoproteína mas abundante en la superficie plaquetaria y está presente en aproximadamente 50.000 copias por plaqueta. Se forma por la heterodimerización de las GPIIb y la GPIIIa. Es un receptor multifuncional ya que es capaz de unir por lo menos cuatro proteínas adhesivas: Fg, FvW, vitronectina y fibronectina. La unión del Fg es esencial para la agregación de plaquetas (42). Bajo condiciones de altas fuerzas de cizallamiento como puede ser en las arterias estenóticas, la agregación puede estar mediada por la unión del FvW a la GPIIbIIIa. La capacidad de estas cuatro proteínas de unirse a la GPIIbIIIa es debido a la secuencia de reconocimiento Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) que esta presente en cada uno de estos ligandos (43). Si bien el complejo GPIIbIIIa se encuentra presente en la superficie de plaquetas en reposo, únicamente durante la activación de las plaquetas se produce un cambio conformacional de la GPIIbIIIa que permite el acceso de ligandos macromoleculares como el Fg a su sitio de unión. El Fg se une primero reversiblemente y luego de forma irreversible al complejo GPIIbIIIa de cada plaqueta produciendo la unión entre ellas.

• Secreción

Cuando las plaquetas son activadas además de unirse unas con otras pueden liberar el contenido de los gránulos, fenómeno que se conoce como reacción de liberación o secreción. El contenido de los gránulos de depósito es expulsado de la célula sin perder los constituyentes de otros compartimentos subcelulares. La expulsión ocurre por exocitosis en un tiempo de 10 a 120 seg. y a través de la fusión de las membranas de los gránulos con la membrana plasmática o con el sistema

canicular abierto (sistema de membranas que permite el egreso y el ingreso de sustancias a la plaqueta). Los productos secretados promueven la agregación adicional de plaquetas generando un proceso de retroalimentación positiva que culmina con la formación de un trombo plaquetario. En forma paralela a la activación plaquetaria, y a consecuencia de la injuria endotelial, se produce la activación de la cascada de coagulación que conduce a la formación de una malla de fibrina la cual consolida y estabiliza el trombo (44).

Las plaquetas poseen tres tipos de gránulos citoplásmicos: α , densos y lisosomas.

- **Los gránulos α .** Contienen el factor plaquetario 4 que se une a la heparina neutralizando su actividad y la β -tromboglobulina que posee baja afinidad por la heparina y es capaz de inhibir la acción de la prostaciclina. Este tipo de gránulos tiene al menos siete glicoproteínas diferentes involucradas en la adhesión celular pero sólo algunas son secretadas. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y de crecimiento tumoral. Los gránulos α contienen selectina-P, que al ser secretada queda retenida sobre la superficie plaquetaria a fin de actuar como receptor para los leucocitos. También se encuentran factores de coagulación como el Fg, factor V y el FvW (45-47).
- **Los gránulos densos.** Contienen reservorios intracelulares de adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) no metabólico junto con Ca^{2+} , Mg^{2+} , histamina y 5-hidroxitriptamina. Todas estas moléculas excepto el ATP, tienen la capacidad de estimular a otras plaquetas circundantes. Además también expresan en su membrana selectina-P (48-50).
- **Lisosomas.** De estas vesículas son liberadas diversas hidrolasas ácidas cuya actividad es máxima a un pH de 3.5 a 5.5. Su función es digerir sustancias que la célula ha endocitado. La liberación de las hidrolasas ácidas es más lenta y requiere mayores concentraciones del agonista que las necesarias para liberar el contenido de los gránulos α y de los gránulos densos. Los lisosomas contienen β -glucuronidasa, β -galactosidasa, catepsinas, y una endoglucosidasa capaz de degradar el heparán sulfato (51,52).

Mecanismos involucrados en la activación plaquetaria

En las plaquetas la interacción de los agonistas con sus receptores da como resultado la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima hidroliza el fosfatidil inositol 4-5 bifosfato dando como resultado la formación de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃) (53). El DAG activa la proteína quinasa C. Esta última fosforila a una proteína de 47 kDa, que es una de las proteínas involucradas en el fenómeno de secreción de los gránulos plaquetarios. El IP₃ es una sustancia polar que se moviliza desde la membrana al citoplasma, principalmente al sistema tubular denso (sistema de membranas donde se encuentra el mayor depósito de calcio y enzimas necesarias en la síntesis de prostaglandinas) desde donde promueve la salida del Ca²⁺ al citoplasma. Una vez producidos los aumentos en los niveles de Ca²⁺ intracelular, éste activa a la calmodulina que a su vez activa a una quinasa que va a fosforilar a una proteína de 20 kDa que es la cadena liviana de la miosina (54). La fosforilación de esta proteína permite la interacción entre los filamentos de actina y miosina desencadenando junto con la fosforilación de la 47 kDa la secreción de los gránulos (55).

Otro mediador de la activación plaquetaria es el Tromboxano A₂ (TxA₂) que en plaquetas, es el producto final del metabolismo del ácido araquidónico a través de la enzima ciclo-oxigenasa (56). El TxA₂ una vez formado se libera al medio extracelular e interacciona con su receptor específico en la plaqueta que le dio origen o en otras circundantes. La unión del TxA₂ a su receptor da como resultado la exposición de los receptores para Fg y la activación de la PLC con la consecuente formación de segundos mensajeros que amplifican la respuesta de activación plaquetaria.

El ADP como se mencionó antes se encuentra en los gránulos densos. Al ser liberado al medio extracelular interacciona con sus receptores específicos. Existen dos sitios de unión para el ADP. Uno es una proteína de 100 kDa, que al interaccionar con el ADP induce el cambio de forma, la exposición de los receptores del Fg y la agregación. La interacción del ADP con el otro sitio de unión produce la inhibición de la adenilato ciclase hecho que favorece el fenómeno de agregación al mantener bajos los niveles de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (57).

El ADP junto con el DAG, IP₃ y TXA₂ cumplen un rol esencial en el mecanismo de retroalimentación positiva de la agregación plaquetaria.

FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS GRANULOCÍTICAS.

Caracterización del G-CSF.



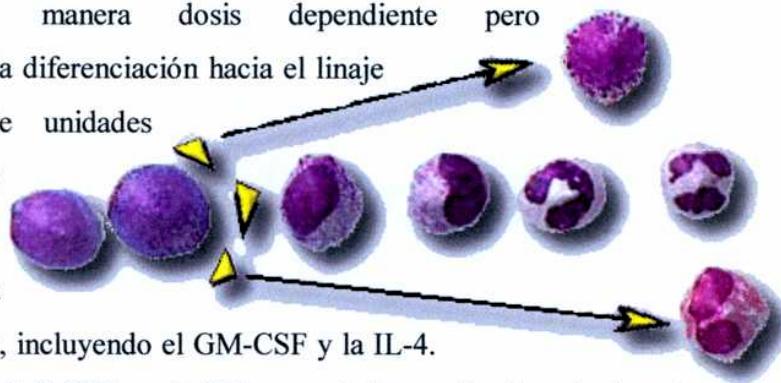
Este factor es secretado por monocitos activados, macrófagos y neutrófilos (58). Frente a estímulos proinflamatorios también se produce en células del estroma, fibroblastos, células endoteliales, células tumorales y células de la musculatura lisa vascular (59-61). Es una glicoproteína O-glicosilada de 19.6 kDa con un punto isoeléctrico de 5.5. Su forma biológicamente activa es monomérica. Contiene cinco residuos de cisteína, de los cuales cuatro forman puentes disulfuro (en las posiciones 36-42; 64-74) (62). La mitad de los azúcares de este factor no se requieren para su completa actividad biológica. El gen tiene un tamaño de 2.5 kilobases (kb) e incluye cinco exones. El G-CSF humano se localiza en el cromosoma 17q21-q22 (63)

Estructura del receptor y expresión génica.

El receptor del G-CSF se expresa en todas las células del linaje granulocítico/neutrófilo y en monocitos (64). El receptor humano tiene un tamaño de 836 aa y una Mr entre 100 y 130.000. Muestra los clásicos elementos de algunos otros receptores de citoquinas como por ejemplo un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio transmembrana y otro citoplasmático. El receptor une al G-CSF con alta afinidad ($K_d = 550 \text{ pM}$). El gen que codifica para el receptor humano (CSF3R) se localiza en el cromosoma 1p32-p34. De la maduración alternativa del RNAm resultan por lo menos cuatro formas diferentes de este receptor. Una variante contiene una delección de la región transmembrana y es la forma soluble del receptor (65)

Actividades biológicas.

Esta molécula estimula la proliferación y diferenciación de CMP hacia el linaje granulocito/neutrófilo de manera dosis dependiente pero fundamentalmente permite la diferenciación hacia el linaje granulocítico a partir de unidades formadoras de colonias gránulo/monocíticas (66).



El G-CSF sinergiza con algunas otras citoquinas, incluyendo el GM-CSF y la IL-4.

Por ejemplo, se requieren el G-CSF y el GM para el desarrollo de colonias de neutrófilos in-vitro. Por otro lado, para el crecimiento de colonias mixtas de progenitores eritroides tempranos, se necesita la acción concertada del G-CSF y la EPO. La combinación del G-CSF y la IL-4 ejercen una supresión sinérgica del crecimiento de algunas líneas celulares leucémicas (67).

El G-CSF no solamente es el factor humoral responsable de la granulocitopoyesis sino también incrementa los mecanismos de defensa del huésped mediados por PMN aumentando la respuesta hacia distintas sustancias proinflamatorias. Los neutrófilos maduros son activados funcionalmente por su factor de crecimiento. El G-CSF provoca un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra células tumorales in-vitro (68). Modifica la expresión de receptores para IgG, reduce la quimiotaxis de los neutrófilos y aumenta la síntesis prolongada de especies reactivas del oxígeno (69,70). También modifica las características funcionales, bioquímicas y de supervivencia de células fagocíticas (71).

En otros tipos celulares, el tratamiento de plaquetas con G-CSF da como resultado un incremento de la reactividad plaquetaria frente a un estímulo secundario (72).

Uso e importancia clínica.

La principal y más importante aplicación clínica del G-CSF es el tratamiento de las leucopenias que proceden a la quimio y/o radioterapia (73). También se lo utiliza para el

tratamiento de pacientes con neutropenia crónica severa de distintos orígenes con el fin de evitar complicaciones infecciosas causadas por esta enfermedad (74-77) Otra aplicación de esta citoquina es el enriquecimiento de progenitores mieloides en autotransplantes de médula ósea (78).

LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Los PMN desempeñan un papel fundamental en la defensa del organismo contra los microorganismos agresores constituyendo la primera línea de defensa ya que los mismos están capacitados para seleccionar, ingerir y destruir a la mayoría de los patógenos por los siguientes pasos: a) adherencia al endotelio, b) migración extravascular y migración dirigida, c) opsonización, reconocimiento y adherencia de las partículas, d) englobamiento, e) fusión de los lisosomas con las vacuolas fagocíticas (degranulación) y f) estallido respiratorio.

En condiciones normales sólo una parte de los PMN se encuentra en circulación mientras que otra parte sale de los vasos sanguíneos constituyendo una reserva. Los PMN se producen en la médula ósea y tienen una vida corta (2-3 días). Constituyen alrededor del 60-70% del total de leucocitos circulantes (el número normal de PMN en individuos normales es de 5.000-10.000/ml de sangre) (79).

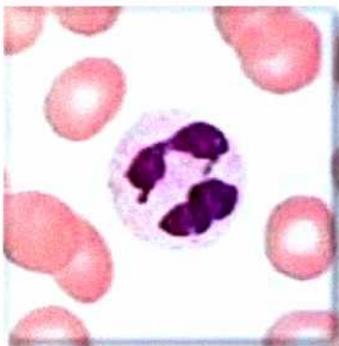
Como su nombre sugiere, las formas maduras contienen un núcleo multilobulado y gran cantidad de gránulos. Aunque estas células no muestran ningún tipo de especificidad para los antígenos, desempeñan un papel importante en la inflamación aguda junto con los anticuerpos y el complemento en la protección contra los microorganismos. El papel predominante de los PMN es la fagocitosis.

Se distinguen 3 clases de PMN, de acuerdo con la reacción de tinción de sus gránulos con los colorantes histológicos:

- neutrófilos, que presentan gránulos que no serán coloreados intensamente.
- eosinófilos, que presentan gránulos que se evidencian en color rojo-anaranjado brillante.

- basófilos, cuyos gránulos tienen un color negro-azul bajo las mismas condiciones de coloración.

Neutrófilos.



Constituyen más del 90% de los granulocitos (polimorfonucleares). Son de vida media corta y se producen en la médula ósea a razón de unos 100.000 millones por día. Son circulantes excepto cuando son reclutados a tejidos en inflamación. Su núcleo es multilobulado (de 2 a 5 lóbulos). Tras salir de la médula ósea, circulan por la sangre durante 7-10 horas, y luego pasan a tejidos, donde mueren a los 2-3 días.

Cuando hay un proceso infeccioso la médula ósea produce más cantidad de neutrófilos. Son los primeros fagocitos en llegar a la zona de infección atraídos por quimiotaxis debida a sustancias liberadas en el foco inflamatorio. Al llegar, ingieren la partícula extraña incluyéndola en un fagosoma al que fusionan sus gránulos para digerir y eliminar la partícula extraña con mecanismos dependientes del oxígeno más potentes que los del macrófago. Poseen gránulos citoplásmicos de dos tipos: los azurófilos (primarios) y los específicos (secundarios) (80).

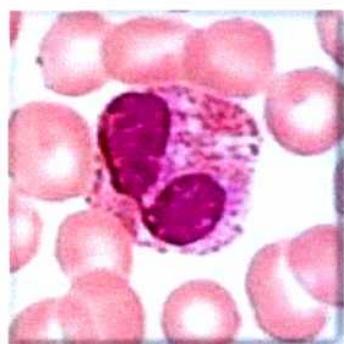
- **Gránulos azurófilos:** son mayores y más densos, con típica morfología de lisosoma. Contienen mieloperoxidasa y agentes antimicrobianos no oxidantes (defensinas, catepsina G y lisozima) (81-83).
- **Gránulos específicos:** son más pequeños y menos densos a los electrones; contienen la mayor parte de la lisozima de la célula, citocromo C, lactoferrina y fosfatasa alcalina. También contienen factores quimiotácticos como C5a y la opsonina C3b. La membrana de los gránulos específicos contiene un inhibidor de la protein-quinasa C, cuya función es la regulación negativa de la actividad del neutrófilo. También expresa receptores para C3b, laminina y para el péptido formilado metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (81-84).

Los gránulos secundarios son movilizados al espacio extracelular en respuesta a varios estímulos, por ejemplo: péptidos N-formilados liberados por bacterias, proteínas del

complemento o leucotrienos. La liberación de gránulos secundarios y gránulos azurófilos se encuentran bajo controles separados.

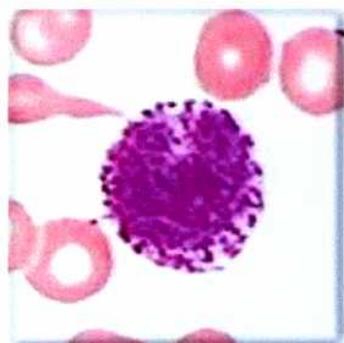
Los mecanismos de adhesión, extravasación y migración hacia tejidos inflamados están mediados por citoadhesinas. El CD11b es una proteína de membrana de los leucocitos y forma parte de la familia de las integrinas. Estas moléculas de adhesión celular constan de dos cadenas o subunidades una α y otra β . Se conocen 15 variantes de la subunidad α y 8 de la β . Las distintas combinaciones de cadenas α y β dan lugar a las subfamilias de las integrinas. El CD11b es la cadena αM del complejo CR3 (también conocido como MAC-1) en el cual la cadena β es la $\beta 2$ llamada CD18 y forma parte de la subfamilia integrina- $\beta 2$ (85). La función principal de las integrinas- $\beta 2$ de los leucocitos es interactuar con moléculas de adhesión presentes en la membrana plasmática del endotelio vascular y permitir la unión intercelular, con el consecuente pasaje de los leucocitos hacia el tejido dañado (diapédesis).

Eosinófilos.



Representan el 2-5% de los leucocitos sanguíneos. Al igual que los neutrófilos son capaces de fagocitar y destruir los microorganismos ingeridos. Los gránulos eosinofílicos presentan abundante cantidad de peroxidasa, enzimas lisosomales y contienen algunas proteínas con actividad antiparasitaria que inducen la liberación de histamina desde los basófilos y mastocitos. Tienen menor actividad bactericida que los neutrófilos. (79,80).

Basófilos.



Se encuentran en muy escaso número en la circulación (menos del 0.2 % de los leucocitos). Sus gránulos poseen heparina la cual es liberada en el proceso de degranulación que se pone de manifiesto cuando es estimulado por algún alergeno. Estos últimos deben estar unidos a la IgE ya que el receptor activador de la degranulación en estas células es el Fc- ϵ (79).

INTERACCION ENTRE PLAQUETAS Y PMN.

La activación tanto de plaquetas como de PMN libera sustancias capaces de estimular el otro tipo celular generando una cascada de amplificación en las respuestas funcionales de ambos tipos celulares.

Los PMN activados son capaces de inhibir la activación plaquetaria por liberación de diversas moléculas que actúan sobre distintos mecanismos de la función de las plaquetas. La liberación de óxido nítrico aumenta los niveles intracelulares de GMPc disminuyendo los niveles de Ca^{2+} que resulta en la supresión de la agregación y liberación del contenido de los gránulos (86). La liberación de elastasa produce inhibición de la agregación inducida con trombina por su efecto de clivar la GPIb plaquetaria.(87) La presencia de ADPasas en la membrana de los PMN también ejercen efectos inhibitorios (88).

Además, diferentes productos derivados de los PMN como mieloperoxidasa, peróxido de hidrógeno, anión superóxido y el factor activador de plaquetas (PAF) directamente inducen activación plaquetaria (89). Otras sustancias como los leucotrienos (LT) C4, D4 y E4 si bien no tienen acción directa potencian la agregación inducida por adrenalina (90). La participación de las serino-proteasas en la activación plaquetaria inducida por los PMN también fue postulada. Entre ellas, la catepsina G es una serino-proteasa presente en los gránulos azurófilos de los PMN y actúa utilizando un receptor específico en las plaquetas. El mecanismo de acción de la catepsina G es a través de la exposición de receptores para el Fg (91).

Estudios in-vitro mostraron que la liberación del contenido granular de plaquetas activadas tiene efectos en los PMN cercanos a ellas. Por ejemplo, la liberación de factor plaquetario 4 es quimiotáctico para PMN (92). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), es capaz de inducir quimiotaxis y fagocitosis pero bloquea el estallido respiratorio inducido por agonistas leucocitarios (93,94). También es liberada la β -tromboglobulina de los gránulos α y puede ser clivada por monocitos produciendo el péptido activador de neutrófilos (NAP-2) que posee propiedades activadoras similares al NAP-1 (IL-8) (95).

La liberación de ADP y ATP debida a la liberación de gránulos densos de plaquetas activadas produce un aumento en el Ca^{2+} intracelular en PMN y aumenta su estallido respiratorio inducido por otros agonistas (96). Además el PAF puede ser generado por ambos tipos celulares y este es un potente estímulo para los PMN. También se generan intermediarios de la cascada del ácido araquidónico en plaquetas como el ácido 12-hidroperoxi-eicosatetraenoico el cual induce la biosíntesis de leucotrieno en PMN y es, además, un agente quimiotáctico (97).

Otro aspecto de la interacción entre plaquetas y PMN activados es la formación de agregados mixtos. Si bien los mecanismos involucrados en este fenómeno aún no están totalmente establecidos, la selectina-P y en menor grado el complejo glicoproteico IIbIIIa están involucrados (98,99). La selectina-P está en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel Palade de las células endoteliales y es expresada sobre la superficie celular una vez que las células son estimuladas (47). Se cree que los receptores para la selectina-P son estructuras glicoproteicas que contienen ácido siálico las cuales incluyen al sialil Lewis x conocidos como CD15 (100). La adhesión de PMN a plaquetas activadas es importante para el reclutamiento de PMN en los sitios de daño vascular y formación del trombo. In-vivo se detectaron agregados plaquetas/PMN en pacientes con derivación (bypass) cardiopulmonar y en pacientes con síndrome de distress respiratorio (101,102).

OBJETIVO

Dado el reciente clonado de la TPO, el uso terapéutico de la misma se encuentra en proceso de evaluación en ensayos clínicos en fase II. El G-CSF es utilizado para combatir el riesgo de infección en pacientes que presentan neutropenias congénitas y adquiridas. Uno de los mayores potenciales usos terapéuticos de la TPO es en pacientes con aplasia medular. En estos pacientes, la administración de TPO sería en forma conjunta con el G-CSF.

Teniendo en cuenta que ambos factores de crecimiento son capaces de activar tanto las plaquetas como los leucocitos, los pacientes que reciban simultáneamente ambas drogas podrían aumentar el riesgo de episodios trombóticos.

El objetivo de esta tesis de licenciatura fue evaluar el efecto de la TPO y del G-CSF solos y en combinación sobre respuestas funcionales in-vitro de plaquetas y de PMN humanos.

MATERIALES Y METODOS.

Reactivos y anticuerpos: Anticuerpos monoclonales (MoAbs) provistos por Immunotech (Marsella, Francia): anti-CD42b (GPIb) conjugado con ficoeritrina (PE) y anti-CD62p (selectina-p) ambos conjugados con isoftiocianato de fluoresceína (FITC), fueron utilizados como marcadores de plaquetas. Como marcadores leucocitarios se utilizaron anti-CD11b (subunidad α M del complejo CR3) y anti-CD18 (subunidad β 2 del complejo CR3), ambos conjugados con FITC.

La TPO humana recombinante (rHu) fue provista por R&D Systems (Abington, Inglaterra). El G-CSF rHu, ADP, fMLP y la trombina fueron provistos por Sigma, Saint Louis. MO.

Muestras de sangre: Fueron obtenidas a partir de donantes sanos quienes no habían tomado medicación durante por lo menos diez días previos a la toma de muestra. La extracción se realizó por punción venosa del antebrazo, y se colectó la sangre directamente en tubos plásticos conteniendo anticoagulante.

Agregación plaquetaria. Se valoró según la técnica de agregometría descripta por Born (103) El plasma rico en plaquetas (PRP) fue preparado por centrifugación de sangre citratada (0.38%) a 180 x G durante 10 min.

La agregación plaquetaria fue registrada en un Lumi-agregómetro marca Chrono-Log. Es básicamente un fotómetro consistente en una fuente de luz blanca de bajo voltaje, un imán recubierto de plástico el cual permite realizar una agitación constante (en estos experimentos se utilizó la velocidad de 1000 revoluciones por minutos que es la utilizada generalmente), un elemento eléctrico calentador que mantiene la temperatura constante (37°C) y una célula fotoeléctrica que recibe los rayos de luz que atraviesan la muestra. Esta célula fotoeléctrica está acoplada a un circuito electrónico que permite ajustar la sensibilidad y los niveles basales de densidad óptica (DO). El agregómetro está conectado a un graficador que transfiere las señales a un papel. El registrador

grafica a lo largo del tiempo la variación de la transmisión de luz. La máxima interferencia de la transmisión de la luz se pone de manifiesto cuando las plaquetas están en reposo bajo agitación constante ya que no se unen entre sí y se distribuyen en forma homogénea en toda la suspensión. Después del agregado de algún estímulo ocurre un aumento inicial de la DO debido a que la plaqueta cambia de discoide a esférica. Esto es rápidamente seguido por una disminución en la DO a medida que las plaquetas se agregan entre ellas permitiendo un mayor pasaje de luz a través de la muestra.

La agregación fue medida en alícuotas de 0.4 mL de PRP a 37°C bajo agitación continua y fue monitoreada por 5 a 30 minutos. La agregación se expresó como el % de la máxima transmisión de luz. En los experimentos que no se utilizaron citoquinas, se reemplazó el mismo volumen por su diluyente (dPBS con albúmina sérica bovina 0.1%, pH=7.4) y se preincubó con el PRP durante el mismo tiempo y a la misma temperatura que las muestras tratadas con citoquinas.

Liberación de trifosfato de adenosina intraplaquetario. La liberación de ATP fue medida por luminiscencia utilizando un Lumi-agregómetro. Este aparato además del sistema que mide agregación posee un tubo luminiscente que permite detectar la emisión de energía liberada por la reacción entre la luciferin luciferasa (LL), el ATP y el O₂. El agregado de LL al PRP permite detectar la liberación de ATP simultáneamente con la agregación plaquetaria. La cantidad de ATP liberada se determina agregando al final de cada muestra una cantidad de ATP conocida y registrando el salto de luminiscencia emitida por la misma. La liberación de ATP se expresó en µmoles/L de ATP.

Expresión de GPIb y selectina-P de plaquetas. A partir de muestras de sangre anticoaguladas con EDTA (0.2%), se obtuvo el PRP por sedimentación globular espontánea, el cual se utilizó como fuente de plaquetas. Alícuotas de 45 uL de una suspensión de plaquetas diluidas 1:10 en tampón dPBS fueron

tratadas con TPO, G-CSF, ambas citoquinas o dPBS/BSA (0.1%) que es el diluyente de las citoquinas durante 15 min. a temperatura ambiente (TA). Luego 5 uL de muestra fueron transferidos a 50 uL de dPBS conteniendo concentraciones saturadas de anticuerpos anti-CD42b-PE o anti-CD62p-FITC e incubados a TA durante 30 min. Después de la fijación con paraformaldehído (PF) (1%), las plaquetas fueron analizadas por citometría de flujo. Los controles negativos fueron anticuerpos anti-IgG₁ de ratón conjugados con PE o FITC, utilizados a una concentración equivalente a las de IgG₁. En algunos experimentos, luego de la incubación de plaquetas con citoquinas, las células fueron estimuladas con trombina durante 3 min.

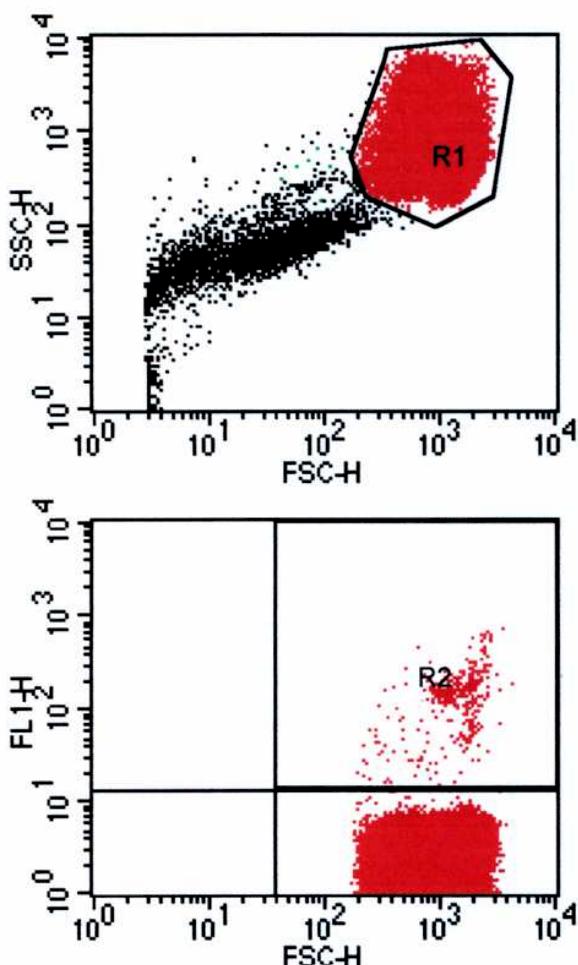
La expresión de la GPIb se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia y la de selectina-P en porcentaje de células positivas para el CD62p.

Expresión de CD 11b en PMN. Los PMN humanos fueron aislados a partir de un gradiente de Dextran y Ficoll-Isopaque (Densidad = 1.077 g/cm³) de sangre anticoagulada con EDTA. Los glóbulos rojos fueron lisados por shock hipotónico con agua destilada. La pureza de la suspensión de PMN fue de un 95% aproximadamente, evaluada por un recuento diferencial de leucocitos en frotis coloreado según el método de May-Grunwald/Giemsa. La expresión de CD11b con o sin citoquinas fue evaluada de forma similar a la descripta para glicoproteínas de plaquetas. La expresión del CD11b se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Agregados entre plaquetas y PMN (agregados mixtos): A partir de muestras de sangre citratada (0.38%) se transfirieron 5 uL de las mismas a 50 uL de solución tampón HBSS conteniendo una concentración saturante de anti-CD42b-PE, anti-CD18-FITC y RGDS. La formación de agregados mixtos fue estimulada con trombina durante 3 min. Se agregaron 5 uL de la muestra a 400 uL de

solución tampón HBSS y fueron analizadas inmediatamente por citometría de flujo según el método utilizado por Goodall Li N y col. (104).

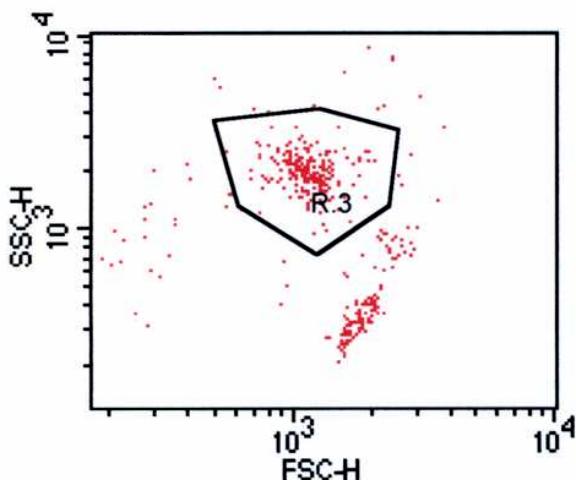
Citometría de flujo: El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo utilizando un citómetro Becton Dickinson. La fluorescencia atribuida a los anticuerpos conjugados con FITC y la debida a los conjugados con PE fue obtenida mediante la excitación con un láser de Argón a 488 nm. La forma de emisión del FITC y de la PE fue medida usando filtros de banda de 525 nm y 585 nm respectivamente. El porcentaje de células positivas fue corregido descontando el porcentaje de células positivas (1%) en el control de isotipo dentro de esa misma región de integración. Tanto para las plaquetas como para los PMN se graficó la FL1 vs los eventos utilizando una escala logarítmica.



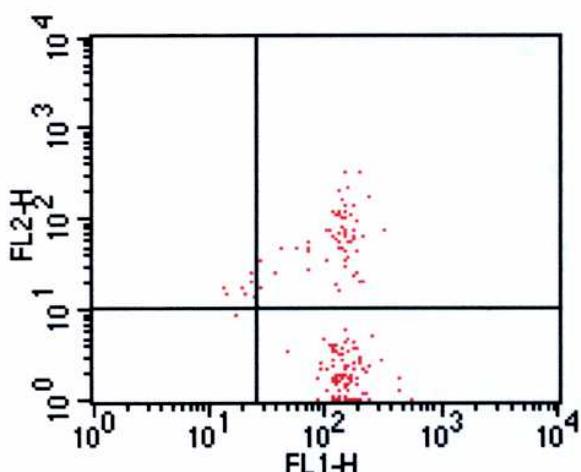
Para evaluar los agregados mixtos, haciendo una región (R1) dentro del gráfico forward light scatter (desviación frontal de la luz relacionada con el tamaño de las células) vs. side light scatter (desviación ortogonal de la luz relacionada con la complejidad intracelular de las células) se excluyeron las plaquetas aisladas.

Luego se hizo un gráfico de la fluorescencia verde (FITC) vs. forward light scatter con los eventos de la R1 y se seleccionaron las células positivas para CD18 (PMN y monocitos) generando R2.

Los cuadrantes del gráfico anterior se establecieron utilizando isotipos FITC y PE.



En un tercer gráfico, los eventos de la R2 se representaron según su tamaño y complejidad intracelular para eliminar los monocitos por sus características morfológicamente diferenciales generándose una R3.



Con los PMN ya aislados (R3) se hizo un gráfico de la fluorescencia verde en función de la roja (PE).

Los cuadrantes de este último gráfico fueron establecidos utilizando un gráfico de FL1 vs. FL2 de la población total, marcada con isotipos de tal forma que el 99% de las células estuvieran dentro del cuadrante inferior izquierdo.

Análisis estadístico: Se utilizó un test de Student para datos pareados para determinar la significación de las diferencias entre las medias y $p<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Efecto de la TPO y G-CSF en agregación de plaquetas y liberación de ATP intraplaquetario.

En primer lugar se evaluó la capacidad de la TPO de estimular las plaquetas directamente. La adición de TPO en un rango de 10-500 ng/mL a un PRP no produjo ni agregación plaquetaria ni liberación de ATP (n=7). Con el fin de establecer si la TPO potenciaba respuestas funcionales inducidas por agonistas plaquetarios se evaluó el efecto de la TPO en la agregación y liberación de ATP inducida por una concentración submáxima de ADP. Se consideró respuesta submáxima a la máxima concentración de ADP capaz de producir agregación primaria o reversible sin liberación de ATP. Esta concentración se estableció a partir de una curva concentración respuesta de ADP realizada en cada muestra y el rango de la misma fue 0.5-1 uM.

La Fig. 1 muestra que la preincubación del PRP durante 15 min. con TPO (100 ng/ml) potenció significativamente la agregación plaquetaria ($p<0.05$) y la liberación de ATP ($p<0.05$) inducidas por una concentración submáxima de ADP. Los resultados obtenidos fueron $23\pm3\%$ de agregación en las muestras estimuladas con ADP y $70\pm6\%$ en la muestra preincubada con TPO (n=4). Los valores obtenidos para la liberación de ATP fueron 0.2 ± 0.1 y 2.3 ± 0.7 uM respectivamente (n=4). La primera ola de agregación reversible y sin liberación de ATP en plaquetas pretratadas con TPO, la respuesta fue transformada en una primera y segunda ola de agregación acompañada de la liberación de ATP intraplaquetario (Fig. 1).

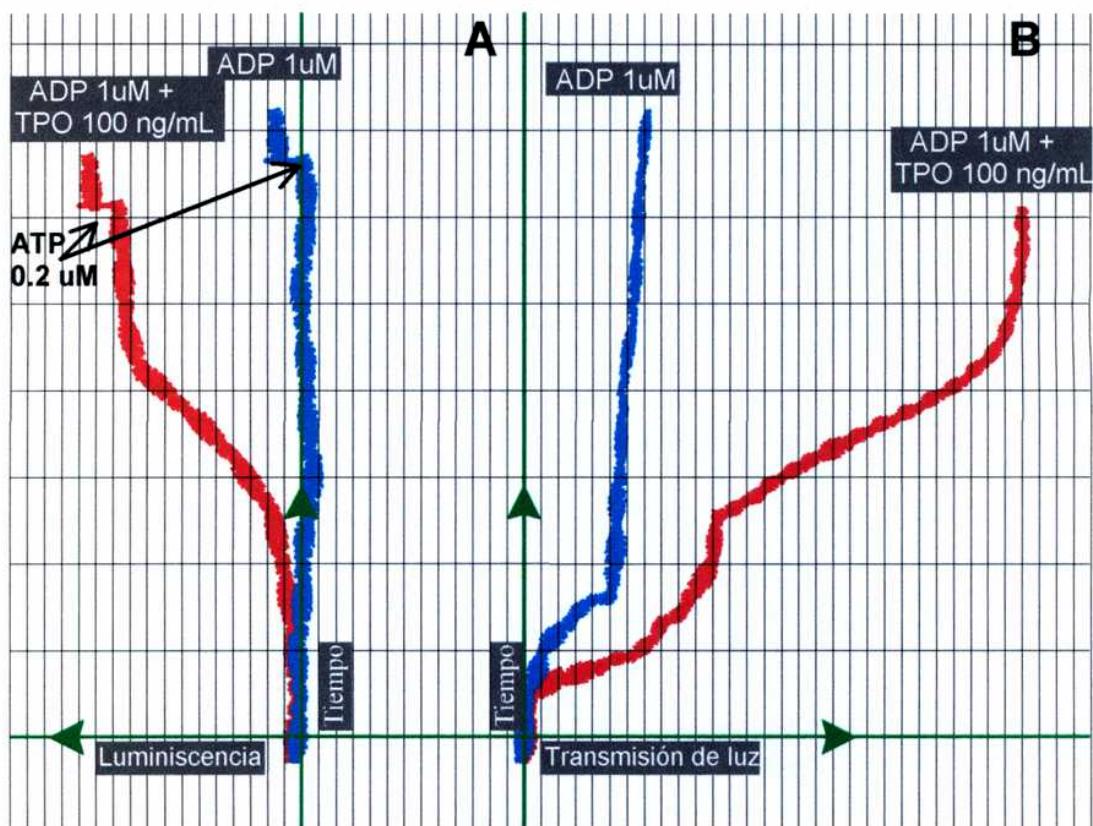


Figura 1. (A) liberación de ATP intraplaquetario. (B) Agregación.

La concentración de 100 ng/mL de TPO se consideró óptima ya que la preincubación de plaquetas con 10 ng/mL de TPO no mostró sinergismo en la respuesta de agregación o de liberación de ATP inducida por ADP ($n=5$) y el tratamiento de plaquetas con 50 ng/mL de TPO no produjo un efecto constante ya que solamente 2 de 6 experimentos mostraron un aumento en la respuesta de activación plaquetaria. Dado que este incremento fue observado en todos los casos en los cuales se utilizó 100 ng/mL, esta concentración de TPO se utilizó en el resto de los experimentos.

La adición de G-CSF (10-500 ng/mL) no fue capaz de inducir ninguna respuesta plaquetaria y contrariamente a lo que ocurrió con la TPO en ningún caso fue capaz de potenciar la agregación plaquetaria ni la liberación de ATP inducida por ADP. Los valores

obtenidos en las muestras preincubadas con G-CSF (100 ng/mL) fueron 32±3 % para la agregación plaquetaria y 0.2±0.1 uM para la liberación de ATP (n=4) inducida por ADP. Estos valores no fueron significativamente distintos de los obtenidos en plaquetas estimuladas solamente con ADP (23±3 % y 0.2±0.1 uM respectivamente).

El aumento producido por la TPO en la agregación (70±6 %) y en la liberación de ATP (2.3±0.7 uM) inducida por ADP no fue modificado significativamente por el tratamiento simultáneo de las plaquetas con G-CSF (100 ng/mL) y TPO (100 ng/mL). Los resultados obtenidos fueron 72±6 % para la agregación y 2.9±0.9 uM para la liberación de ATP (n=4). La incubación de ambas citoquinas por un tiempo mayor (30 min) y con una concentración mayor de G-CSF (250 ng/mL) no dio resultados diferentes a los obtenidos con 15 min de incubación y 100 ng/mL de G-CSF.

Efecto de la TPO y G-CSF sobre la expresión de GPIb y de selectina-P.

En los experimentos siguientes se analizó el patrón de expresión de GPIb y de selectina-P en respuesta a la TPO y al G-CSF. Inicialmente se evaluó el efecto de las citoquinas por si mismas. Se incubaron las plaquetas durante 15 min. con TPO (100 ng/ml), G-CSF (100 ng/ml) o con ambas citoquinas simultáneamente. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos respecto del control (plaquetas incubadas con dPBS/BSA 0.1% que era el diluyente de las citoquinas) tanto en la expresión de las GPIb como de la selectina-P en la membrana plasmática (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la agregación y liberación de ATP se probó la capacidad de estas citoquinas de modular la respuesta de plaquetas frente a otros agonistas. Nuevamente para cada experimento en primer lugar se determinó la concentración submáxima de trombina. La misma se obtuvo a partir de curvas concentración respuesta. Tanto para la expresión de la GPIb como de la selectina-P se eligió aquella concentración que produjo alrededor del 30% de la máxima respuesta inducida por trombina. El rango obtenido fue 0.5-0.1 U/mL de trombina.

Los resultados de las Fig. 2 y 3 muestran que la disminución en las moléculas de GPIb de la superficie de la membrana plaquetaria inducida por trombina fue aumentada significativamente cuando las plaquetas fueron tratadas con TPO (100 ng/mL), G-CSF (100 ng/mL) o ambas citoquinas.

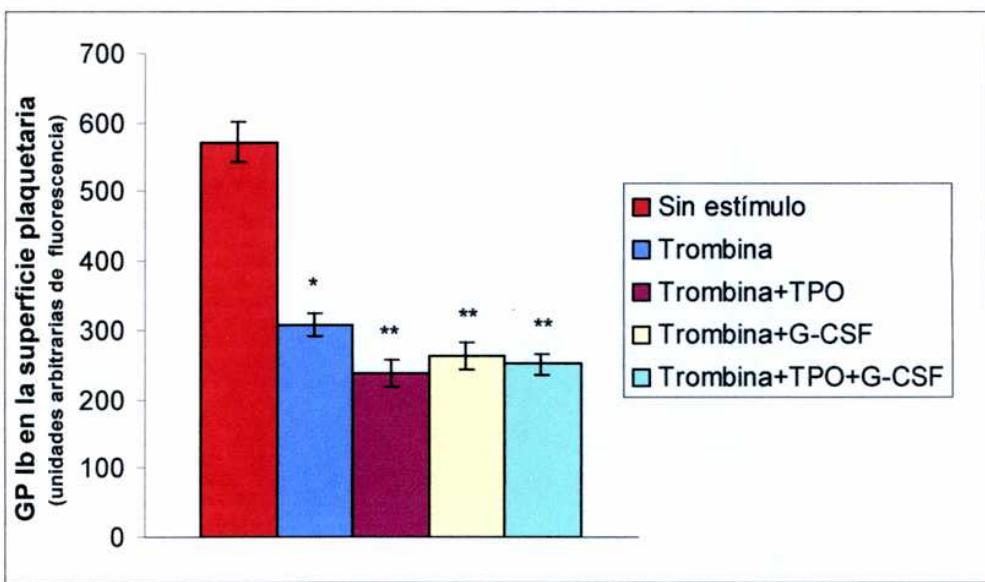


Figura 2. Expresión de GPIb en plaquetas. Los valores representan la media ± el error estándar de la mediana de intensidad de fluorescencia de 7 experimentos independientes. (*) p<0.05 respecto de plaquetas no estimuladas. (**) p<0.05 respecto de plaquetas estimuladas con trombina.

La Fig. 3 muestra que el efecto de la trombina sobre la GPIb fue una pérdida en la cantidad de moléculas de GPIb por célula evidenciado por una disminución en la intensidad de fluorescencia (IF). El tratamiento de las plaquetas con TPO o G-CSF aumentó esta disminución en la IF y no fue lo suficientemente potente como para producir la desaparición del marcador de la membrana plaquetaria. Se puede observar en la figura que en todos los casos la población positiva para CD42b fue >95 %.

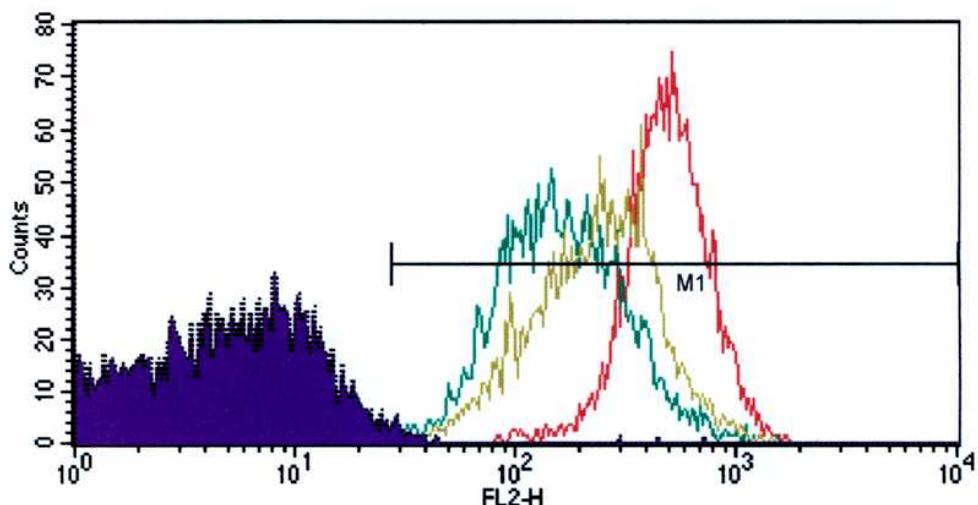


Figura 3. Efecto de la TPO sobre la expresión de la GPIb. La población violeta representa la FL2 del isotipo (mediana=6); la roja plaquetas en reposo (mediana=542), la marrón plaquetas estimuladas con trombina (0.1 U/mL) (mediana=348) y la verde plaquetas preincubadas con TPO (100 ng/mL) y estimuladas con trombina (0.1 U/mL) (mediana=241). Las tres últimas muestras fueron marcadas con anti-CD42b-PE.

La expresión de selectina-P en la membrana plaquetaria inducida por trombina fue incrementada por la preincubación de las células con TPO pero no por el tratamiento con G-CSF. En condiciones de reposo la plaqueta no expresa selectina-P en la superficie de la membrana plaquetaria. La estimulación con trombina da como resultado la translocación de la selectina-P desde los gránulos alfa hacia la superficie de la plaqueta. La preincubación de las plaquetas con TPO aumentó la cantidad de células que expresaron selectina-P. (Fig. 4 y 5).

Tanto la pérdida de la GPIb como el incremento en la selectina-P no fue modificado por el tratamiento simultáneo con ambas citoquinas (Fig. 2 y 4).

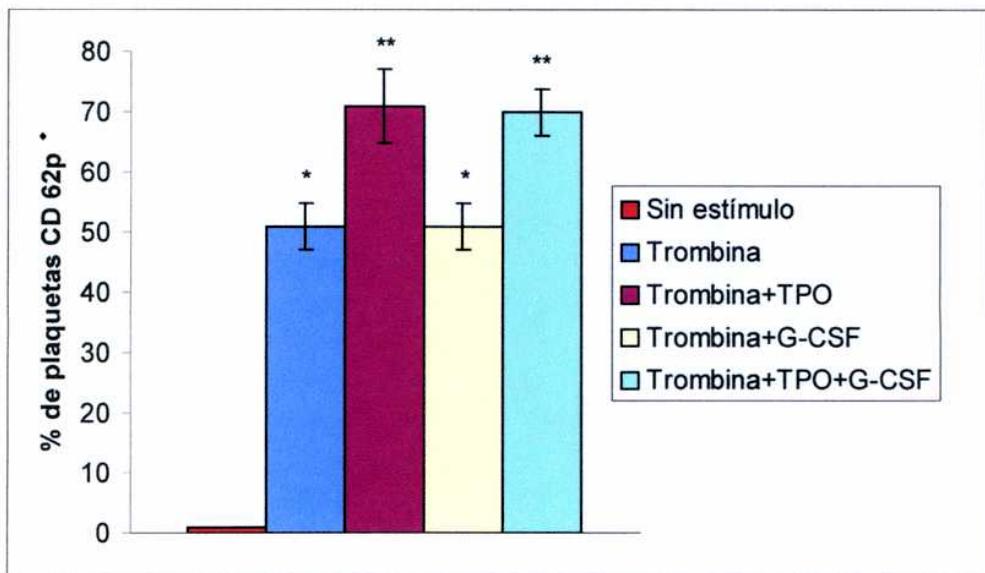


Figura 4. Expresión de selectina-P en plaquetas. Los valores representan la media ± el error estándar del % de células CD62+ de 7 experimentos independientes. (*) p<0.05 respecto de plaquetas no estimuladas. (**) p<0.05 respecto de plaquetas estimuladas con trombina.

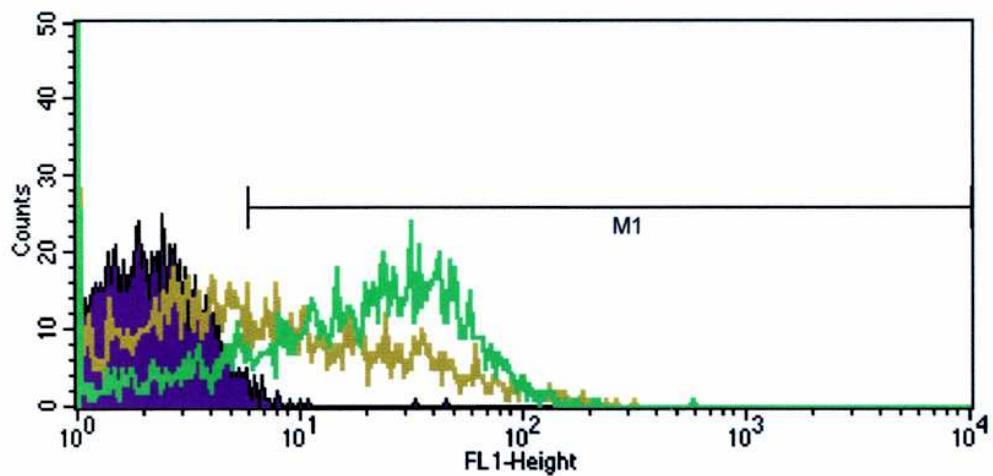


Figura 5. Histograma de fluorescencia correspondiente a la expresión de selectina-P. Efecto La población violeta representa la FL1 del isotipo y plaquetas no estimuladas marcadas con anti CD62p (menos de 1 % de células positivas); la amarilla plaquetas estimuladas con trombina (0.1 U/mL) (47 % de células positivas) y la verde plaqueas preincubadas con TPO (100 ng/mL) y estimuladas con trombina (0.1 U/mL) (71 % de células positivas).

Efecto de la TPO y G-CSF sobre la expresión de CD11b en leucocitos PMN.

Contrariamente a lo observado con la TPO, el G-CSF fue capaz de ejercer un efecto directo sobre los PMN ya que la expresión basal de la integrina CD11b en la superficie de los PMN fue significativamente aumentada por la estimulación de los leucocitos con G-CSF (100 ng/mL) (Fig. 6).

La TPO no fue capaz de modificar los niveles basales de CD11b ni la expresión aumentada por el tratamiento con G-CSF. Como se puede ver en la Fig. 6, el G-CSF sinergizó con una concentración submáxima de fMLP (5×10^{-7} M) en la expresión de CD11b mientras que la TPO no tuvo efecto sobre la estimulación inducida por este péptido formilado. Bajo esta condición de estimulación por fMLP, la coincubación de TPO y G-CSF mostró resultados similares a los obtenidos con G-CSF solo.

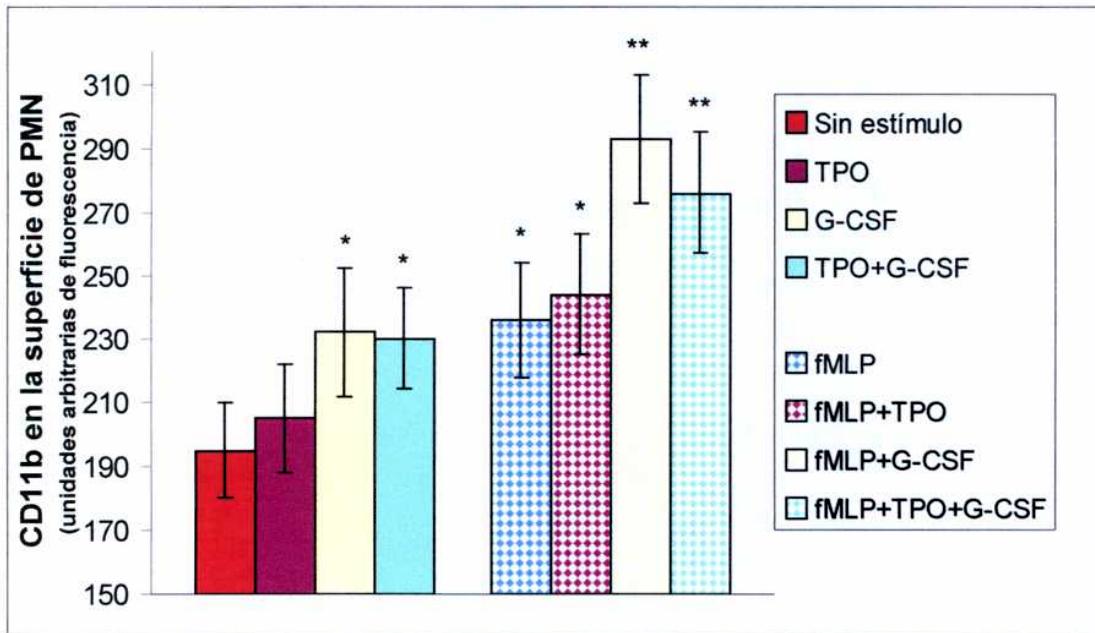


Figura 6. Expresión de CD11b en leucocitos PMN. Los valores representan la media ± el error estándar de la mediana de intensidad de fluorescencia de 7 experimentos independientes. (*) p<0.05 respecto de PMN no estimulados. (**) p<0.05 respecto de PMN estimulados con fMLP (5×10^{-7} M).

Efecto de la TPO y G-CSF sobre la formación de agregados mixtos entre plaquetas y leucocitos PMN.

Finalmente se analizó la capacidad de la TPO y el G-CSF de inducir la formación de agregados mixtos plaquetas/PMN. Para cuantificar la interacción entre plaquetas y PMN se utilizó una inmunofluorescencia de doble marcación que permitió la detección simultánea de estos dos tipos celulares en agregados mixtos.

La formación de agregados mixtos en muestras no estimuladas fue de $10.0 \pm 2.0\%$ ($n=6$). Estos valores no se modificaron significativamente por el tratamiento de las muestras de sangre entera con TPO (100 ng/mL) G-CSF (100 ng/mL) o ambos factores de crecimiento (datos no mostrados). Sin embargo, la formación de agregados mixtos inducida por una concentración submáxima de trombina fue aumentada significativamente por el tratamiento de la sangre entera con TPO (Fig. 7). Este efecto no se puso de manifiesto cuando las muestras fueron tratadas con G-CSF. La presencia de G-CSF junto con TPO no varió significativamente la formación de agregados mixtos respecto de los resultados obtenidos con TPO solo (Fig. 7).

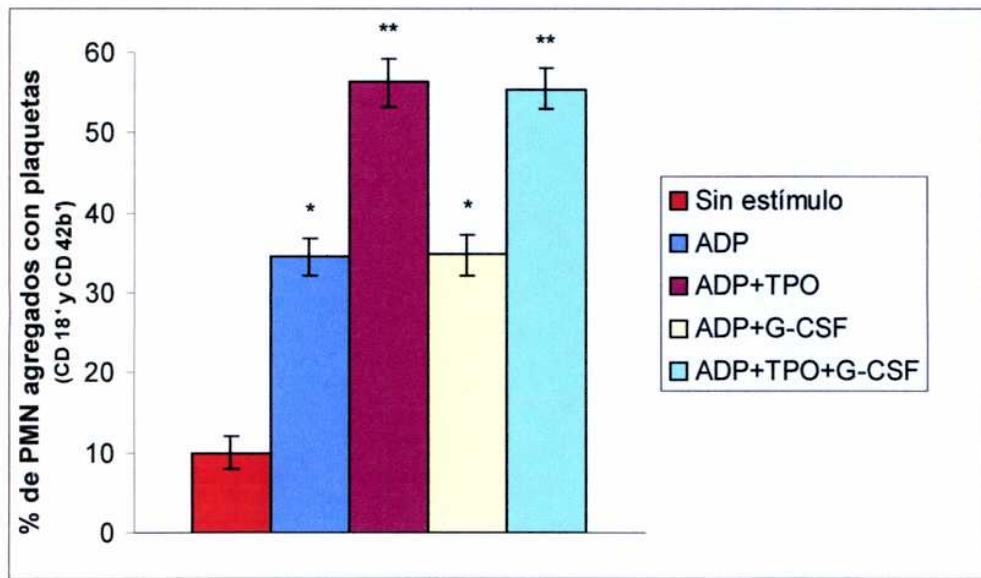


Figura 7. Formación de agregados mixtos en sangre entera. Los valores representan la media ± el error estándar de 4 experimentos independientes. (*) p<0.05 respecto de sangre entera no estimulada. (**) p<0.05 respecto de sangre entera estimulada con trombina.

DISCUSION

En este trabajo se evaluó el efecto de la TPO y del G-CSF sobre respuestas efectoras de las plaquetas y de los PMN. Los resultados obtenidos mostraron que la TPO no tuvo un efecto directo sobre la agregación o la liberación de ATP pero si fue capaz de aumentar ambas respuestas plaquetarias inducidas por ADP.

El rol del G-CSF en la activación plaquetaria no está totalmente esclarecido. Shimoda y col. demostraron que esta citoquina no estimula directamente las plaquetas pero gatilla la activación por otro agonista plaquetario a través de un mecanismo específico de unión al receptor (72). Contrariamente, Oda y col. usando concentraciones fisiológicas de Ca²⁺ no fueron capaces de confirmar este efecto sinérgico del G-CSF (19). Wun y col. mostraron un efecto directo pero moderado del G-CSF sobre la expresión de selectina-P (106). En nuestras condiciones experimentales no se observó efecto del G-CSF sobre la agregación plaquetaria o la liberación de ATP cuando se lo utilizó solo o en combinación con ADP. Además, la presencia de G-CSF no modificó la potenciación mediada por TPO de la respuesta de agregación y liberación de ATP inducidos por ADP. Es posible que las diferencias encontradas entre los distintos grupos esté relacionada con las condiciones experimentales y las concentraciones de G-CSF utilizadas en cada caso.

Estudios previos han demostrado que la activación plaquetaria por trombina induce una redistribución en la expresión de los antígenos de la membrana de las plaquetas. Mientras que la GPIb se internaliza, la selectina-P que en condiciones de reposo no se expresa aparece en la superficie de la membrana de la plaqueta (107,108). Estudios previos demostraron que la TPO y en un menor grado el G-CSF estimulan la expresión de CD62p en plaquetas (106). Nuestros hallazgos muestran que la TPO y G-CSF modularon en forma

diferencial los cambios en la expresión de GPIb y de selectina-P. Mientras que la TPO aumentó la disminución de la GPIb y la externalización de la selectina-P inducida por trombina, el G-CSF solamente aumentó la pérdida de la GPIb. La observación de que el G-CSF solamente regula la expresión de GPIb podría estar relacionada con el hecho de que la internalización del complejo GPIb-IX y la expresión de selectina-P son fenómenos no acoplados entre si. De hecho se ha demostrado que el ADP induce una marcada internalización de la GPIb pero es un débil inductor de la expresión de selectina-P (107). En acuerdo con Wun y col. no encontramos sinergismo entre TPO y G-CSF en la expresión de la GPIb o de la selectina-P.

El receptor de la TPO, el c-mpl, se expresa en plaquetas, Mk, células CD34⁺ y células endoteliales. Brizzi y col. (28) recientemente demostraron que los PMN también expresan el c-mpl y que la TPO regula la activación de estas células. Los autores de este trabajo demostraron que la TPO sinergiza con el fMLP en la producción del estallido respiratorio temprano y que esta citoquina induce directamente la síntesis y liberación de IL-8 en PMN. Estos hallazgos nos llevaron a evaluar la regulación de la expresión del CD11b en la superficie de los PMN producida por TPO y G-CSF. Observamos que la TPO no produjo ninguna regulación en la expresión de CD11b en la superficie del PMN tanto cuando fue usada sola o combinada con fMLP. Por el contrario, como se había demostrado previamente, el G-CSF aumentó la expresión basal de este marcador y también sinergizó con el fMLP. Mas aún, el incremento en los niveles de CD11b producidos por el G-CSF no fueron modificados por la TPO sugiriendo que esta citoquina no parece estar involucrada en la regulación de la expresión de esta integrina en los PMN.

La adhesión plaquetas/PMN es de importancia fisiológica no solamente para el gatillado de ambos tipos celulares en sitios inflamatorios y/o hemostáticos sino también en las alteraciones funcionales de éstas células. Se ha sugerido que las interacciones entre plaquetas y PMN pueden tener un papel patogénico en diversas enfermedades como el síndrome de distress respiratorio del adulto, la derivación cardiopulmonar y la ateroesclerosis (102-103). Cuando evaluamos el efecto de las citoquinas en la formación de agregados mixtos plaquetas/PMN encontramos que solamente la TPO aumentó la formación de agregados mixtos inducidos por trombina. Considerando que observamos que la TPO sinergiza con la trombina en la expresión de la selectina-P y teniendo en cuenta que es la principal proteína involucrada en la adhesión de plaquetas a los PMN (98), pensamos que el aumento en la expresión de la selectina-P mediado por TPO es posiblemente el mecanismo responsable del incremento en la formación de agregados mixtos. El reclutamiento de células inflamatorias mediado por plaquetas podría aumentar la cascada hemostática frente a una injuria vascular.

En conclusión los datos obtenidos demuestran que las diversas respuestas funcionales inducidas por la TPO y el G-CSF en plaquetas y PMN no son aumentadas como así tampoco inhibidas por la presencia de ambos factores de crecimiento. Los resultados de este estudio in-vitro pueden no reflejar una situación in-vivo. Sin embargo, dado que la combinación de ambas citoquinas será probablemente usada en forma terapéutica, se necesitan ensayos clínicos para corroborar las interacciones in-vivo entre ambas citoquinas.

**PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO REALIZADO Y REUNIDO EN
ESTA TESIS DE LICENCIATURA.**

- R Pozner, M Schattner, G Collado, A Gorostizaga, MA Lazzari.

Efecto de la trombopoyetina (TPO) y del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) sobre plaquetas. (resumen).

Medicina 1998;58: 577

- R Pozner, M Schattner, G Collado, A Gorostizaga, MA Lazzari.

Efecto del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) y de la trombopoyetina (TPO) sobre leucocitos polimorfonucleares. (resumen).

Medicina 1998;58: 590.

- Mirta Schattner, Roberto Pozner, Alejandra Gorostizaga, María Lazzari.

Effect of thrombopoietin (Tpo) and granulocyte colony stimulating factor (G-csf) on platelets and polymorphonuclear leukocytes (PMN). (trabajo aceptado y premiado para su presentación en el XVII th Congress. International Society for Thrombosis & haemostasis, August 14-21, 1999, Washington DC, USA.

- Mirta A Schattner, Roberto G Pozner, Alejandra B Gorostizaga, María A Lazzari.

Effect of thrombopoietin and granulocyte colony stimulating factor on platelets and polymorphonuclear leukocytes. (trabajo enviado a publicación al American Journal of Clinical Pathology).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rothstein G. Origen y desarrollo de la sangre y los tejidos hematopoyéticos. En Wintrobe Hematología Clínica. Editores: Lee GR, Bithell TC, Foester J, Athens JW y Lukens JN. 1994; BsAs, Inter-Médica SAICI Capítulo 3 pag 40-8.
2. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol* 1958;20:350-5.
3. Wendling F, Varlet P, Charon M y col. A retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemia disorder in mice. *Virology* 1986;149:242-6.
4. Vigon I, Mornon JP, Cocault L y col. Molecular cloning and characterization of MLP, the human homolog of the v-mpl oncogen: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5640-4.
5. Long MW, Heffner CH, Williams JL y col. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest* 1990;85:1072-84.
6. Methia N, Louache F, Vainchenker W y col. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993;82:1395-401.
7. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD y col. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-38.
8. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P y col. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-24.

9. Lok S, Kaushansky K, Holly RD y col. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-68.
10. Kuter DJ, Beeler DL y Rosenberg RD. The purification of megapoietin: A physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11104-8.
11. Gurney AL, Kuang W-J, Xie M-H y col. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995;85:981-8.
12. Hokom MM, Lacey D, Kinstler OB y col. Pegylated megakaryocyte growth and development factor abrogated the lethal thrombocytopenia associated with carboplatin and irradiation in mice. *Blood* 1993;82:445-55.
13. Brody VC, Lin NL y Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth factor and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 1995;85:1719-26.
14. Schattner M, Lefebvre P, Spanier Mingolelli S y col. Thrombopoietin-stimulated ex vivo expansion of human bone marrow megakaryocytes. *Stem Cells* 1996;14:207-14.
15. Kaushansky K, Brody VC, Grossmann A y col. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. *J Clin Invest* 1995;96:1683-7.
16. Debili N, Wendling F, Katz A y col. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 1995;86:2516-25.

17. de Sauvage F, Carver-Moore K, Luoh S y col. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996;183:2367-72.
18. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ y col. Thrombocytopenia in c-mpl - deficient mice. *Science* 1994;265:1445-47.
19. Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ y col. Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress. *Blood* 1996;87:4664-70.
20. Fontenay-Roupie M, Huret G, Loza JP y col. Thrombopoietin activates human platelets and induces tyrosine phosphorylation of p80/85 cortactin. *Thromb Haemostas* 1998;79:195-01.
21. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ y col. Thrombopoietin and thrombin induce tyrosine phosphorylation of Vav in human blood platelets. *Blood* 1997;89:2789-98.
22. Chen J, Herceg-Harjacek L, Groopman JE y col. Regulation of platelet activation in vitro by the c-mpl ligand, thrombopoietin. *Blood* 1995;86:4054-60.
23. Philipp CS, Remmler J y Zucker-Franklin D. The effects of Mpl-ligand, interleukin-6 and interleukin-11 on megakaryocyte and platelet alpha-granule proteins. *Thromb Haemostas* 1998;80:968-75.
24. Brizzi MF, Battaglia E, Rosso A y col. Regulation of polymorphonuclear cell activation by thrombopoietin. *J Clin Invest* 1997;99:1567-84.
25. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E y col. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl - mediated binding to platelets. *Blood* 1996;87:2154-61.

26. Kuter DJ y Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85:2720-30.
27. Vadhan-Raj S, Murray LJ, Bueso-Ramos C y col. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Intern Med* 1997;126:673-81.
28. Souyri M, Vigno I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990;63:1137-40.
- .
29. Kimura T, Kaburaki H, Tsujino T y col. Signal transduction by the peptide which mimics the activity of thrombopoietin. *Biochem Mol Biol Int* 1998;44:1203-9.
30. Kuwaki T, Hagiwara T, Yuki C y col. Quantitative analysis of thrombopoietin receptors on human megakaryocytes. *FEBS Lett* 1998;427:46-50.
31. Cohen-Solal K, Vitrat N, Titeux M y col. High-level expression of Mpl in platelets and megakaryocytes is independent of thrombopoietin. *Blood* 1999;93:2859-66.
32. Harker LA. Therapeutic cytokine stimulation of thrombocytopoiesis. *Transfus Sci* 1998;19:149-62.
33. Beveridge R, Schuster M, Waller E y col. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth factor (PEG-rHuMGDF) in breast cancer patients (Pts) following autologous bone marrow transplantation (ABMT). *Blood* 1997;90:1:580. abstract.

34. Kuter D, McCullough J, Romo J y col. Treatment of platelet (PLT) donors with pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) increases circulating PLT counts (CTS) and PLT apheresis yields and increases platelet increment in recipients of PLT transfusions. *Blood* 1997;90:579. abstract.
35. Roskam J, Hughes J, Bounameaux Y y col. The part played by platelets in the formation of an efficient hemostatic plug. *Thromb Diath Haemorrh* 1959;3:510-15.
36. White JG. The submembrane filaments of blood platelets. *Am J Pathol* 1969;56:267-77.
37. Fox JEB, Aggerbeck LA y Berndt MC. Structure of the glycoprotein Ib-IX complex from platelet membranes. *J Biol Chem* 1988;263:4882-90.
38. Weiss HJ, Turitto VT y Baumgartner HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelet deficient in glycoproteins IIbIIIa, Ib and storage granules. *Blood* 1986;67:322-30.
39. Sakariassen KS, Fressinaud E, Girma JP y col. Role of platelet membrane glycoproteins and von Willebrand factor in adhesion of platelets to subendothelium and collagen. *Ann N Y Acad Sci* 1987;516:52-65.
40. Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM y col. Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J Clin Invest* 1989;83:288-97.
41. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS y col. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991;78:1760-9.
42. Plow EF, Ginsberg MH, y Marguerie GA. Expression and function of adhesive proteins on the platelet surface. En: *Biochemistry of Platelet*. Editores: Phillips DR, Shuman MA 1986;Orlando, Academic Press: pag. 225.

43. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30-3.
44. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. En: *Hemostasis and Thrombosis*. Editores: Colman R, Hirsh J, Marder V y Salzman EW. 1994; Pennsylvania J.B.Lippincott Company: Capítulo 24: pag. 524-45.
45. Sander HJ, Slot JW, Bouma BN y col. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4 and beta-thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *J Clin Invest* 1983;72:1277-87.
46. Wencel-Drake JD, Painter RG, Zimmerman TS y col. Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin and von Willebrand factor in frozen thin sections. *Blood* 1985;65:929-38.
47. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL y col. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is located in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989;84:92-96.
48. Ugurbil K, Holmsen H y Shulman RG. Adenine nucleotide storage pools and secretion in platelets as studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2227-31.
49. Tranzer JP, Da Prada M y Pletcher A. Letter to editor. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature* 1966;212:1574-79.
50. Martin JH, Carson FL y Race GH. Calcium containing platelet granules. *J Cell Biol* 1974;60:775-7.
51. Dangelmaier CA, Holmsen H. Determination of acid hydrolases in human platelets. *Anal Biochem* 1980;104:182-91.

52. Bentfield ME, Bainton DF. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest* 1975;56:1635-49.
53. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol triphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
54. Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1653-7.
55. Imaoka T, Lynhan JA y Haslam RJ. Purification and characterization of the 47.000-dalton protein phosphorylated during degranulation of human platelets. *J Biol Chem* 1983;258:11404-14.
56. Hamberg M, Svensson J y Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandins endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2994-8.
57. Kahn NN, Sinha AK. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase activity of human blood platelet membrane by ADP. *Biochim Biophys Acta* 1989;984:113-8.
58. Sallerfors B. Endogenous production and peripheral blood levels of granulocyte-macrophage (GM-) and granulocyte (G-) colony-stimulating factors. *Leuk Lymphoma* 1994;13:235-47.
59. Stolze B, Emmendorffer A, Corbacioglu S y col. Effects of bone marrow fibroblasts on the proliferation and differentiation of myeloid leukemic cell lines. *Exp Hematol* 1995;23:1378-87.
60. Zoellner H, Filonzi EL, Stanton HR y col. Human arterial smooth muscle cells synthesize granulocyte colony-stimulating factor in response to interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 1992;80:2805-10.

61. Caldwell J, Emerson SG. Interleukin-1 alpha upregulates tumor necrosis factor receptors expressed by a human bone marrow stromal cell strain: implications for cytokine redundancy and synergy. *Blood* 1995;86:3364-72.
62. Lu HS, Boone TC, Souza LM y col. Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys* 1989;268:81-92.
63. Kanda N, Fukushige S, Murotsu T y col. Human gene coding for granulocyte-colony stimulating factor is assigned to the q21-q22 region of chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 1987;13:679-84.
64. Nagata S, Fukunaga R. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Prog Growth Factor Res* 1991;3:131-41.
65. Fukunaga R, Seto Y, Mizushima S y col. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8702-6.
66. Demetri, GD y Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991;78:2791-08.
67. Maekawa T, Sonoda Y, Kuzuyama Y y col. Synergistic suppression of the clonogenicity of U937 leukemic cells by combinations of recombinant human interleukin 4 and granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1992;20:1201-7.
68. Lopez AF, Nicola NA, Burgess AW y col. Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors. *J Immunol* 1983;131:2983-8.
69. Iacobini M, Palumbo G, Bartolozzi S y col. Superoxide production by neutrophils in children with malignant tumors treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Haematologica* 1995;80:13-7.

70. Tanimura M, Kobuchi H, Utsumi T y col. Neutrophil priming by granulocyte colony stimulating factor and its modulation by protein kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1045-52.
71. Begley CG, Lopez AF, Nicola NA y col. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood* 1986;68:162-6.
72. Shimoda K, Okamura S, Harada N y col. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J Clin Invest* 1993;91:1310-13.
73. DeLuca E, Sheridan WP, Watson D y col. Prior chemotherapy does not prevent effective mobilisation by G-CSF of peripheral blood progenitor cells. *Br J Cancer* 1992;66:893-9.
74. Boxer LA, Hutchinson R y Emerson S. Recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor in the treatment of patients with neutropenia. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62:39-46.
75. Furukawa T, Takahashi M, Moriyama Y y col. Successful treatment of chronic idiopathic neutropenia using recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Ann Hematol* 1991;62:22-4.
76. Marlon PV, Wright SJ y Taylor KM. Granulocyte colony stimulating factor in the management of chronic neutropenia. *Med J Aust* 1992;156:729-31.
77. Weston B, Todd RF 3d, Axtell R y col. Severe congenital neutropenia: clinical effects and neutrophil function during treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Lab Clin Med* 1991;117:282-90.

78. Johnsen HE, Hansen PB, Plesner T y col. Increased yield of myeloid progenitor cells in bone marrow harvested for autologous transplantation by pretreatment with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:229-34.
79. Células que intervienen en las respuestas inmunitarias. En: Inmunología. Editores: Roitt I, Brostoff J y Male D. 1994;España, Ediciones Gráficas y Académicas: pag. 216- 218.
80. Bainton DF. Phagocytic cells: Developmental biology of neutrophils and eosinophils. En: Inflammation. Basis principles and clinical correlates. Editores: Gallin JI, Goldstein IM y Snyderman R. 1988;USA, New York. Raven Press: Capítulo 16, pag. 265-80.
81. Bainton DF, Ulliyot JL y Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow: Origin and content of azurophil and specific granules. *J Exp Med* 1971;134:907-34.
82. Bretz U, Baggolini M. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1974;63:251-69.
83. Cramer E, Pryzwansky KB, Villeval J y col. Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold. *Blood* 1985;65:423-32.
84. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann E y col. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 1985;134:2580-7.
85. Hogg N, Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunology Today* 1995;16:327-30.

86. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM y col. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. Biochem J 1989;261:293-6.
87. Aziz KA, Cawley JC, Kamiguti AS y col. Degradation of platelet glycoprotein Ib by elastase released from primed neutrophils. Br J Haematol 1995;91:46-54.
88. Zatta A, Pandolfo L, Caparrotta L y col. Platelet aggregation induced by the endoperoxide analogue U46619 is inhibited by polymorphonuclear leukocyte ADPase activity. Artheroscler Thromb 1993;13:696-701.
89. Levine PH, Weinger RS, Simon J y col. Leukocytes-platelet interactions. Release of hydrogen peroxide by granulocytes as a modulator of platelet reaction. J Clin Invest 1986;57:955-63.
90. Mehta P, Mehta J y Lawson D. Leukotrienes potentiate the effects of epinephrine and thrombin on human platelet-aggregation. Thromb Res 1986;41:731-8.
91. Ferrer-Lopez P, Renesto P, Schattner M y col. Activation of human platelets by C5a-stimulated neutrophils: a role for cathepsin G. Am J Physiol 1990;258:C1100-07.
92. Deuel TF, Senior RM, Chang D y col. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophil and monocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:4584-7.
93. Tzeng DY, Deuel TF, Huang JS y col. Platelet-derived growth factor promotes polymorphonuclear leukocytes activation. Blood 1984;64:1123-8.
94. Wilson E, Laster SM, Gooding LR y col. Platelet-derived growth factor stimulates phagocytosis and blocks agonist-induced activation of the neutrophil oxidative burst: A possible cellular mechanism to protect against oxygen radical damage. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:2213-7.

95. Walz A, Baggolini M. A novel cleavage product of beta-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:969-75.
96. Moon DG, van Der Zer H, Weston LK y col. Platelet modulation of neutrophil superoxide anion production. *Thromb Haemostas* 1990;63:91-95.
97. Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G y col. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence in the rabbit. *Thromb Haemostas* 1999;81:442-8.
98. Larsen E, Celi A, Gilbert GE y col. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-12.
99. Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I y col. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemostas* 1993;70:514-21.
100. Larsen E, Palabrica T, Sajer S y col. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNFI (CD15). *Cell* 1990;63:467-471.
101. Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM y col. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 1992;79:1201-05.
102. Heffner JE, Sahn SA y Repine JE. The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders?. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:482-6.
103. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-32.

104. Goodall Li N, Hjemdahl P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet leukocyte-aggregates. Br J Haematol 1997;99:808-16.
105. Wun T, Paglieroni T, Hammond WP y col. Thrombopoietin is synergistic with other hematopoietic growth factors and physiologic platelet agonists for platelet activation. Am J Hematol 1997;54:225-32.
106. Hourdillé P, Heilmann E, Combrié R y col. Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. Blood 1990;76:1503-13.
107. Michelson AD, Ellis PA, Barnard MR y col. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate or an in vivo wound. Blood 1991;77:770-79.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Dr. J. L. Jones".A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Dr. D. S.". There is a horizontal line underneath the signature.