

Tesis de Posgrado

Estudios moleculares de citoquinas relacionadas con fibrosis medular en la trombocitemia esencial

Lev, Paola Roxana

2003

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Lev, Paola Roxana. (2003). Estudios moleculares de citoquinas relacionadas con fibrosis medular en la trombocitemia esencial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3637_Lev.pdf

Cita tipo Chicago:

Lev, Paola Roxana. "Estudios moleculares de citoquinas relacionadas con fibrosis medular en la trombocitemia esencial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3637_Lev.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES

**Estudios Moleculares de Citoquinas
Relacionadas con Fibrosis Medular en la
Trombocitemia Esencial.**

Tesis Doctoral de
Paola Roxana Lev

Directora de tesis
Dra. Felisa C. Molinas

Consejera de estudios
Dra. Lilia Lauría

Laboratorio de Hematología Investigación
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari
Facultad de Medicina, UBA

2003

3637

AGRADECIMIENTOS

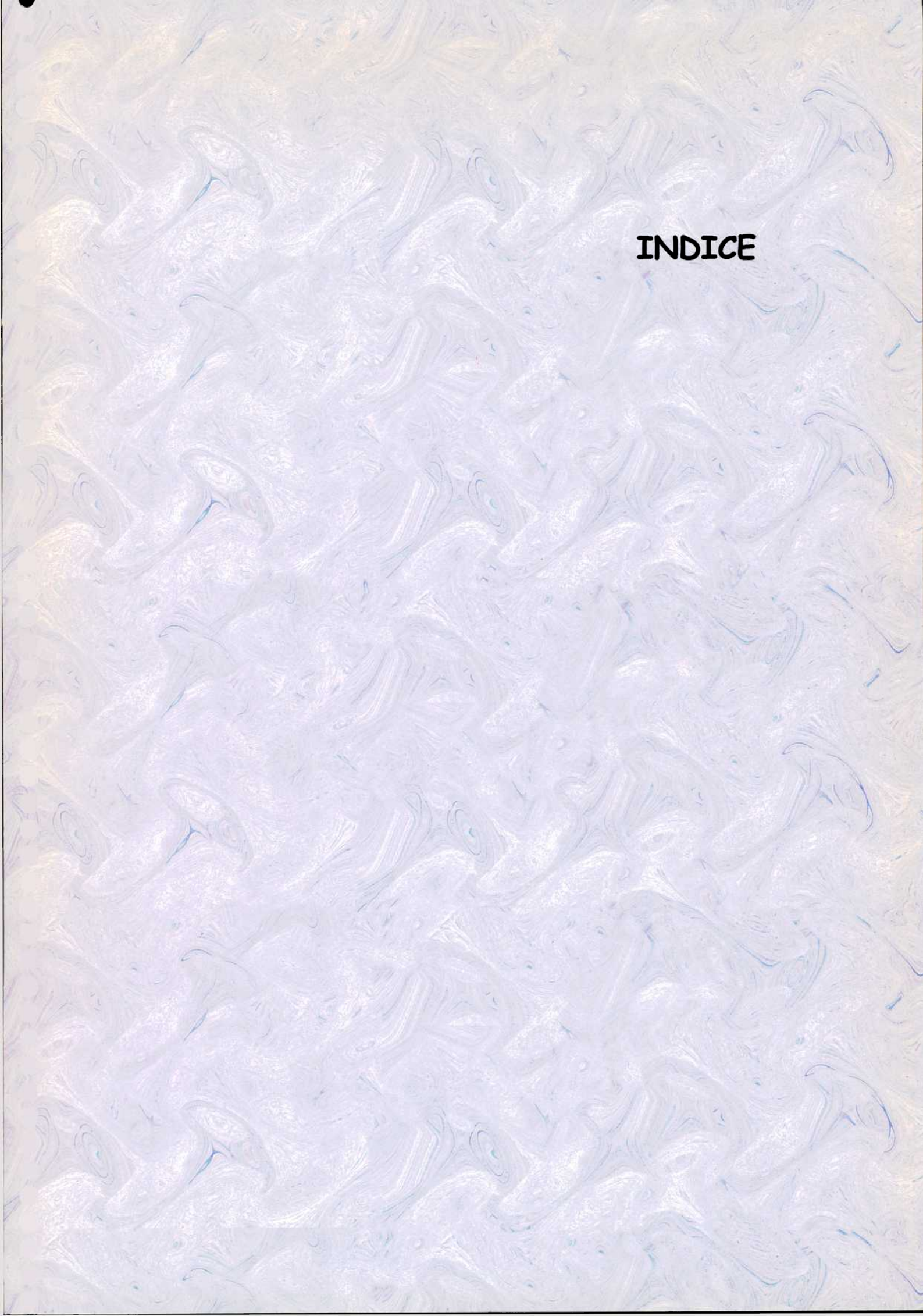
Quiero agradecer principalmente a la Doctora Felisa Molinas que me permitió realizar mi tesis en su laboratorio, por guiarme en este difícil camino de la ciencia, por apoyarme y dirigirme.

Al Dr. Carlos Pirola por su invalorable colaboración, su paciencia y su entera disponibilidad.

A todas las personas del laboratorio que con su enorme perseverancia supieron acompañarme, comprenderme y ayudarme cuando los necesite.

A todos mis compañeros y al personal del instituto que mediante su desinteresada donación de sangre hicieron posible el desarrollo de mi proyecto.

A mi familia y amigos que me incentivaron tanto en los buenos y como en los malos momentos brindándome su apoyo y comprensión.



INDICE

INDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Enfermedades Mieloproliferativas.....	12
1.1.1 Desordenes Mieloproliferativos Philadelphia Negativos.....	14
1.2 Megacariocitos y Plaquetas.....	28
1.2.1 Megacariocitos.....	28
1.2.2 Plaquetas.....	31
1.3 Factor de Crecimiento Transformante.....	49
1.3.1 Estructura del TGF β	49
1.3.2 Receptores del TGF β	51
1.3.3 Transducción de Señal inducida por TGF β	54
OBJETIVOS.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63

3.1	Sujetos Estudiados.....	63
3.2	Cuantificación proteica.....	65
3.3	RT-PCR semicuantitativa.....	69
3.4	Inmunofluorescencia de Células Mononucleares.....	74
3.5	Citometría de Flujo.....	76
3.6	Agregación Plaquetaria.....	77
3.7	Fosforilación de Proteínas.....	79
3.8	Actividad del Receptor del TGF β	82
3.9	Análisis Estadístico.....	83
3.10	Soluciones.....	83

RESULTADOS..... 87

4.1	Niveles de PDGF.....	88
4.2	Niveles de TGF β	95
4.3	Niveles de bFGF.....	103
4.4	TGF β y Plaquetas Normales	111

DISCUSIÓN..... 125

5.1	Factores de Crecimiento en Enfermedades Mieloproliferativas.....	126
-----	--	-----

5.2	El Efecto del TGF β sobre la Agregación Plaquetaria.....	131
-----	--	-----

	CONCLUSIONES.....	136
--	--------------------------	------------

	BIBLIOGRAFÍA.....	140
--	--------------------------	------------

ABREVIATURAS

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico

DAG: diacilglicerol

EPO: eritropoyetina

ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares

FvW: factor von Willebrand

G6PD: glucosa 6-fosfato dehidrogenasa

GP: glicoproteína

IP₃: inositol trifosfato

LAP: proteína asociada a la latencia

LMC: leucemia mieloide crónica

LTBP: proteína de unión al TGFβ latente

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MMM: mielofibrosis con metaplasia mieloide

PAF: factor activador plaquetario

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIP₂: fosfatidil inositol 4,5 difosfato

PKC : proteína quinasa C

PLA₂: fosfolipasa A₂

PLC: fosfolipasa C

PPP: plasma pobre en plaquetas

PRP: plasma rico en plaquetas

PV: policitemia vera

TE: trombocitemia esencial

TGFβ: factor de crecimiento transformante beta

TPO: trombopoyetina

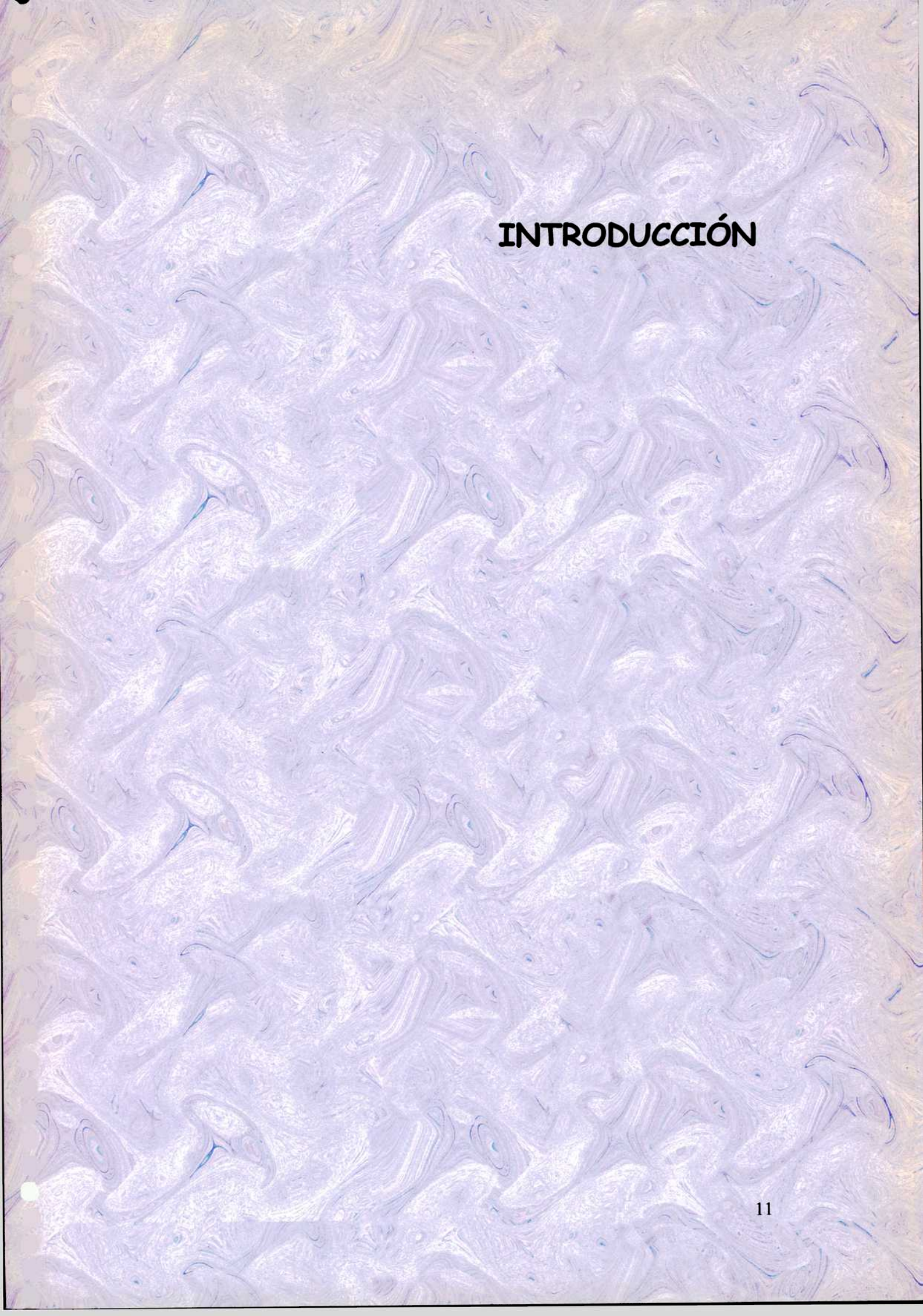
RESUMEN

La trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis con metaplasia mieloide son enfermedades mieloproliferativas crónicas que se caracterizan por aumento de megacariocitos en médula ósea. Los pacientes con TE presentan además, aumento del recuento plaquetario en sangre periférica. Se estudió un grupo de pacientes con TE sin tratamiento y durante la normalización del recuento plaquetario por el tratamiento con anagrelide. En ellos se evaluó el nivel proteico en el plasma y en las plaquetas y el nivel de ARN mensajero intraplaquetario de tres citoquinas relacionadas con el desarrollo de fibrosis medular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Se observó un incremento significativo en el nivel plasmático del PDGF que se normalizó con la reducción del recuento plaquetario por el tratamiento. Los pacientes que tenían fibrosis reticulínica leve en la biopsia de médula ósea mostraron mayores niveles de PDGF plasmático con respecto a los pacientes que no tenían fibrosis. Esta citoquina se encontró disminuida en las plaquetas y nuevamente los valores se normalizaron con el tratamiento. A diferencia de los niveles plasmáticos, los intraplaquetarios no se relacionaron con la presencia o ausencia de fibrosis en la médula ósea. El ARN mensajero se encontró disminuido antes y durante el tratamiento. La normalización del nivel plasmático de PDGF durante el tratamiento puede indicar que su incremento en el plasma se debe a liberación plaquetaria. La disminución del contenido intraplaquetario también podría atribuirse a una disminución de su síntesis en el megacariocito dado que se

encontró disminuido el ARN mensajero. Los niveles plasmáticos del TGF β se encontraron aumentados y los intraplaquetarios normales antes y durante el tratamiento y no se encontró relación con la presencia o ausencia de fibrosis reticulínica leve. El ARN mensajero intraplaquetario se encontró aumentado y se normalizó durante el tratamiento. Dado que el nivel plasmático de esta citoquina permaneció elevado aún con recuento plaquetario normal, se buscó la participación de otra fuente celular en este incremento. Se vió por inmunofluorescencia, la presencia de la citoquina en linfocitos y megacariocitos, la intensidad de marcación fue similar a la de los controles normales. Por lo tanto, los megacariocitos y no los linfocitos podrían ser una posible fuente celular causante del incremento plasmático, dado que su número se encuentra elevado en los pacientes con esta enfermedad. Los niveles plasmáticos e intraplaquetarios del bFGF se encontraron aumentados en los pacientes sin tratamiento y si bien disminuyeron significativamente con la normalización del recuento plaquetario, permanecieron aumentados con respecto al control. No se encontró relación con la presencia o ausencia de fibrosis reticulínica leve en la médula ósea. El ARN mensajero de la citoquina se encontró normal. Dado que el nivel plasmático se reduce cuando se normaliza el recuento plaquetario la liberación de esta citoquina podría ser atribuida en parte a las plaquetas. Pero por otro lado, se buscó la participación de otra fuente celular. Se vió por inmunofluorescencia, la presencia de la citoquina en linfocitos y megacariocitos con intensidad de marcación similar a la de los controles normales. Por lo tanto, también en este caso, los

megacariocitos y no los linfocitos podrían ser una posible fuente celular causante del incremento plasmático. El aumento de estas citoquinas en el plasma de los pacientes con TE puede sugerir que éstas juegan un rol en la patogenia de la enfermedad. Los niveles del TGF β intraplaquetarios normales con el aumento de su ARN mensajero y el aumento intraplaquetario del bFGF con el nivel de su ARN mensajero normal puede indicar una desregulación en su síntesis. Por otro lado se estudió el efecto del TGF β sobre plaquetas normales. Se encontró la presencia de un número bajo de receptores en la membrana plaquetaria y se estudió el efecto de la citoquina sobre la agregación plaquetaria. El efecto del TGF β sobre la función plaquetaria fue variable dependiendo tanto del tiempo de incubación como de la concentración de ADP utilizada como agonista. Se observó que el TGF β potencia la agregación plaquetaria tanto en incubaciones de las plaquetas con la citoquina por periodos cortos como por periodos largos utilizando ADP en bajas concentraciones y tiene el mismo efecto cuando se incuban las plaquetas por periodos largos pero se utilizan concentraciones altas de ADP para inducir la agregación. En cambio, produce un efecto inhibitorio cuando las plaquetas se incuban con la citoquina por periodos cortos y se las estimula con concentraciones de ADP altas. En todos los casos el efecto fue leve y se corresponde con el bajo número de receptores encontrado por plaqueta. Las incubaciones de plaquetas con TGF β in vitro durante tiempos largos podrían semejar situaciones patológicas en donde hay niveles altos de la citoquina durante tiempos prolongados. De esta manera, las plaquetas circulantes están

continuamente expuestas a esta citoquina y ante un estímulo plaquetario las mismas responderían en forma incrementada. Este sería el caso de la TE. La respuesta inhibitoria observada en tiempos cortos podría indicar un posible mecanismo de regulación negativa de la activación plaquetaria ante un estímulo intenso, en el sitio de injuria. Al estudiar el mecanismo por el cual la citoquina modula la función plaquetaria, se vió que cuando la activación plaquetaria está inhibida, la presencia de la citoquina no induce en forma directa la fosforilación de proteínas en residuos tirosinas. Al evaluar la fosforilación de proteínas durante la agregación plaquetaria inducida por ADP, en presencia de la citoquina, se vió una disminución en la intensidad de dos bandas correspondientes a 100 y 105 kd que estan relacionadas con la agregación. Este efecto se observó sólo al incubar las plaquetas durante 5 minutos en presencia de la citoquina y concuerda con el efecto inhibitorio causado por el TGF β en la agregación plaquetaria.



INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDADES MIELOPROLIFERATIVAS

La trombocitemia esencial junto con la mielofibrosis con metaplasia mieloide, la policitemia vera y la leucemia mieloide crónica, son enfermedades mieloproliferativas crónicas (Murphy, 1997). Se postuló que estas enfermedades resultan de una mutación adquirida en una célula progenitora hematopoyética pluripotencial que le da a su progenie una ventaja proliferativa sobre los clones normales (Fialkow, 1981; Blanchard, 1992). Si bien el origen clonal de estas enfermedades está comúnmente aceptado, no están bien caracterizadas las lesiones genéticas que inician o promueven el desarrollo de la mayor parte de ellas (ver mas adelante). Según cual sea la célula progenitora afectada en cada una de estas entidades, el aumento de la proliferación celular será predominante en una de las series hematopoyéticas, a veces con aumento de las otras líneas. En la leucemia mieloide crónica (LMC) se observa un aumento de la proliferación granulocítica (Pahl, 2000); en la policitemia vera (PV) de la serie eritroide (Berlin, 1997); en la trombocitemia esencial (TE) de la línea megacariocítica y la mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) se caracteriza por aumento de megacariocitos y estimulación secundaria de fibroblastos (Tefferi, 1995). Este grupo de enfermedades se consideran preleucémicas y por lo tanto pueden evolucionar hacia formas de enfermedades más agresivas (Emilia, 1993; Silverstein, 1976; Randi, 1996). La tasa de transformación leucémica o fibrótica es variable dentro de cada grupo.

El origen clonal de los síndromes mieloproliferativos se estableció por el estudio de la enzima glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), detectándose que en mujeres heterocigotas para la enzima, sólo una de las isoenzimas se expresa en las tres líneas celulares derivadas de las células hematopoyéticas (Fialkow, 1981). Estos estudios se basan en la alteración del patrón de inactivación del cromosoma X en mujeres (Gale, 1999 a). Más recientemente el grupo de El-Kassar (1997) demostró la clonalidad empleando la técnica de PCR y la transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) para el análisis del gen de la G6PD y de la metilación del gen HUMARA del cromosoma X, estudios también basados en el patrón de inactivación del cromosoma X. En el caso de la TE, el origen clonal de la misma está limitado a un grupo de pacientes (ver mas adelante).

Dentro de los desórdenes mieloproliferativos crónicos, la leucemia mieloide crónica (LMC) es la única enfermedad que se caracteriza por la presencia de un marcador citogenético, el cromosoma *Philadelphia*, que consiste en una translocación entre los cromosomas 9 y 22 que resulta en la formación de un producto de fusión entre el proto-oncogen BCR y la tirosina quinasa c-Abl. Dentro de los síndromes mieloproliferativos crónicos *Philadelphia* negativos, se encuentran las otras tres entidades (PV, TE y MMM) en las que aún no se ha encontrado una mutación genética asociada a las mismas.

1.1.1 Desordenes mieloproliferativos Philadelphia negativos

Policitemia Vera

La policitemia vera se caracteriza principalmente por aumento de la eritropoyesis pero también se observa un incremento en la proliferación de los linajes granulocítico y megacariocítico (Ellis, 1979). Esto resulta en la producción aumentada de glóbulos rojos, asociada al aumento de granulocitos y plaquetas (Bilgrami, 1995). Esta enfermedad puede presentar eventos trombóticos.

El origen clonal de la PV se demostró por el estudio de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como se mencionó anteriormente (Adamson, 1976), si bien las variaciones de las manifestaciones de la enfermedad entre individuos sugiere que la policitemia vera puede desarrollarse de un set de mutaciones geneticamente heterologas (Pahl, 2000).

Otra característica de la PV es la proliferación espontánea de células eritroides. Estudios realizados *in vitro* demostraron que los progenitores eritropoyéticos son hipersensibles a una gran variedad de factores de crecimiento como eritropoyetina (EPO), IL-1 y 3, factor estimulante de colonias granulocito-macrofágico y factor de células progenitoras (*stem cell factor*) (Casadevall, 1982; Dai 1991, 1992; Muller, 1993; De Wolf, 1994). Estas células mostraron además, hipersensibilidad al factor de crecimiento de tipo insulina-I (IGF-1) y aumento de la fosforilación basal del receptor IGF-1 (Correa, 1994; Mirza, 1995). Los progenitores megacariocíticos también se encuentran alterados y son hipersensibles a la trombopoyetina (Martin, 1996). Dado que las células en esta

enfermedad son hipersensibles a una gran variedad de factores de crecimiento se sugiere una posible alteración en las vías de transducción de señales. El receptor de la EPO no se encontró alterado estructural ni funcionalmente, ni se encontraron anomalías genéticas (Hess, 1994; Gregg, 1997; Le Couedic, 1996). Por otro lado se encontró, en granulocitos, fuertemente aumentada la expresión de un receptor de superficie de las células hematopoyéticas recientemente descrito llamado policitemia rubra vera-1 (PVR-1) (Temerinac, 2000).

Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide

La mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) se caracteriza por proliferación clonal de progenitores hematopoyéticos y una extensa fibrosis medular (Ward, 1971) generada posiblemente por megacariocitopoyesis inefectiva. La muerte y/o injuria de los megacariocitos produce liberación de citoquinas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que provocan la estimulación de fibroblastos con proliferación y producción de colágeno (Castro-Malaspina, 1981). El linaje megacariocítico es importante en el desarrollo de esta enfermedad y, a diferencia de la TE, tiene anormalidades morfológicas, en su estructura y maduración, con proliferación y agrupamiento (Thiele, 1991). Los *clusters* de megacariocitos displásicos o necróticos se asocian con la acumulación de tejido fibrótico (Burkhardt, 1974). Los fibroblastos en la mielofibrosis son morfológica y funcionalmente similares a los normales (Castro-Malaspina, 1984 a). En el estroma de la médula ósea se observó un incremento de

la neovascularización con deposición aumentada de colágeno principalmente de tipo I y III (McCarthy, 1985) y otras proteínas de la matriz extracelular (Gay, 1984; Apaja, 1986; Reilly, 1995). El contenido de colágeno de la matriz extracelular de la médula ósea es un proceso muy controlado dependiente de un balance entre su producción y degradación. Por lo tanto, la fibrosis es el resultado de la síntesis incrementada de colágeno y/o la disminución de su degradación por la interacción anormal entre las células hematopoyéticas, las células productoras de colágeno y las colagenasas (Castro-Malaspina, 1982).

Esta enfermedad se caracteriza por presentar anemia, un cuadro leucoeritroblástico con presencia de precursores mieloides y eritroides en sangre periférica y hematopoyesis extramedular (Ward, 1971) (principalmente en bazo e hígado) como consecuencia de un defecto de la célula progenitora proliferante. Según la fase evolutiva de la enfermedad, puede presentar leucocitosis o leucopenia, trombocitosis o trombocitopenia.

Factores de crecimiento y su relación con la mielofibrosis

Castro-Malaspina y col (1981; 1984 b) demostraron la relación entre el aumento de megacariocitos y la mielofibrosis. Postularon que la megacariopoyesis inefectiva lleva a una concentración excesiva de citoquinas en el espacio intramedular, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor plaquetario 4 y como consecuencia se produce aumento de la proliferación de fibroblastos y de la síntesis de fibras de colágeno.

El PDGF, un polipéptido de aproximadamente 30 kd (Heldin, 1985) formado por dos cadenas, se sintetiza principalmente en los megacariocitos, se almacena en los gránulos α de las plaquetas y se libera en los sitios de injuria (Hammacher, 1988; Hart, 1990; Kaplan, 1979). En las plaquetas, la mayor parte del PDGF es un dímero de cadenas A y B, pero también se purificaron los homodímeros (Hammacher, 1988; Ross, 1986). Esta citoquina es el principal mitógeno en suero, estimula el crecimiento y la división celular de fibroblastos y es quimiotáctico para estas células, neutrófilos y monocitos (Reilly, 1994). Se determinó que el PDGF AB y el BB son los mitógenos más potentes sobre los fibroblastos humanos (Ostman, 1989) y que el PDGF AB es más potente en la inducción de la respuesta sobre fibroblastos dermales humanos y sobre células Swiss 3T3 (Hart, 1990).

El PDGF se encontró aumentado en las plaquetas, en el suero y en el plasma de los pacientes con MMM (Martyre, 1991; Caenanzo, 1989; Gersuk, 1989). La liberación anormal por megacariocitos en la médula ósea o por plaquetas en circulación es una posible explicación para el incremento plasmático. Además, el grupo de Katoh (1990) encontró aumentado el ARN mensajero para las dos cadenas del PDGF (A y B) en megacariocitos de pacientes con desórdenes mieloproliferativos.

Sin embargo, la liberación de PDGF no es suficiente para explicar la complejidad del estroma mielofibrótico ya que no tiene, por ejemplo, propiedades angiogénicas ni induce la transcripción de genes como de laminina, tenasina y

fibronectina, proteínas que se hallaron aumentadas en la matriz extracelular de los pacientes con MMM (Gay, 1984; Apaja, 1986; Reilly, 1995). Por lo tanto, se planteó la participación de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante- β (TGF β) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

El factor de crecimiento transformante- β (TGF β) pertenece a una familia de polipéptidos multifuncionales relacionados (TGF β 1, β 2, β 3) que son sintetizados como una molécula precursora siendo luego procesada para dar un monómero de 12,5 kd. La proteína biológicamente activa es un dímero de 25 kd formado por dos monómeros idénticos unidos por puentes disulfuro (Derynck, 1985). Esta citoquina es sintetizada por megacariocitos así como también por el sistema monocito/macrófago, linfocitos y células endoteliales (Fava, 1990; Martyre, 1994; Terui, 1990; Martyre, 1991) y al igual que el PDGF, se almacena en los gránulos α de las plaquetas y se libera en los sitios de injuria (Assoian, 1986; Fava, 1990). La matriz extracelular puede funcionar como un reservorio de la citoquina en forma inactiva ya que ésta se asocia a componentes de la misma y en forma activa ya que se puede unir por ejemplo a fibronectina inmovilizada (Munger, 1997; Tapiale, 1997; Mooradian, 1989).

El TGF β tiene numerosos efectos biológicos, entre ellos es quimiotáctico para fibroblastos y monocitos (Postlethwaite, 1987; Wahl, 1987), regula negativamente la hematopoyesis en estadios tempranos (Ottmann, 1988) y estimula la proliferación de fibroblastos (Roberts, 1986). Además se demostró que

esta citoquina tiene efecto en la reparación de lesiones tisulares y propiedades angiogénicas (Roberts, 1986; 1996; O’Kane, 1997). El efecto más importante en relación con el desarrollo de la fibrosis medular es su capacidad para regular la síntesis de la matriz extracelular, aumentando la transcripción de genes que codifican para fibronectina, colágeno tipo I, III, IV y tenasina (proteínas que se encontraron aumentadas en la MMM) (Sporn, 1987; Pearson, 1988). Además puede disminuir la síntesis de enzimas tipo colagenasas o metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular, mientras que estimula la síntesis de inhibidores de proteasas como el inhibidor del activador de plasminógeno (Overal, 1989; Jackson, 1973). Su efecto es incrementar la síntesis y la acumulación de la matriz extracelular.

El TGF β se encontró aumentado en las plaquetas de pacientes con MMM (Martyre, 1991). El mismo grupo demostró por inmunocitoquímica, que este factor de crecimiento se localiza en megacariocitos. Encontraron además, aumento del ARN mensajero del TGF β en células mononucleares de sangre periférica utilizando la técnica de Northern blot o RT-PCR (Martyre, 1994). Posteriormente comprobaron, en células CD34⁺ (progenitores hematopoyéticos), una significativa disminución de la expresión del receptor del TGF β tipo II, pudiendo ser éste uno de los mecanismos que le permite a los progenitores hematopoyéticos escapar de la inhibición de la proliferación ejercida por el TGF β (Le Bousse-Kerdiles, 1996).

Sin embargo, los megacariocitos no son la única fuente celular de TGF β , ya que se encontraron depósitos de esta citoquina en el estroma de la médula ósea que se correlacionan con fibrosis aún donde el número de megacariocitos esta normal o reducido (Johnston, 1995). Por otro lado, esta proteína es producida por linfocitos y monocitos/macrófagos activados (Rondeau, 1983; Martyre, 1991) y el número de estos últimos está aumentado en la médula ósea de los pacientes con MMM (Titius, 1994). Por lo tanto, además del rol de los megacariocitos en la fibrosis medular, otra población celular podría estar involucrada como fuente de TGF β .

El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) es otra de las citoquinas propuestas como participante en el desarrollo de la mielofibrosis, ya que está involucrada en la proliferación de fibroblastos, angiogenesis, reparación de heridas, modulación de células del estroma y megacariocitopoyesis (Gospodarowicz, 1987; Folkman, 1987; Davidson, 1991; Oliver, 1990; Bruno, 1993; Han, 1992; Avraham, 1994). El bFGF pertenece a una familia de nueve miembros, el primero y el segundo (ácido y básico, respectivamente) son los más estudiados. Sus nombres implican que difieren en sus puntos isoelectricos (pH 5.6 para el ácido y pH 9.6 para el básico) (Baird, 1994). El bFGF es una proteína de 18-24 kd, producida por una variedad de tipos celulares, como células del estroma y células hematopoyéticas incluyendo megacariocitos (Bugler, 1991; Klagsbrun, 1989; Brunner, 1993). La presencia de receptores para la citoquina en la membrana celular sugiere la existencia de un modo de acción extracelular de la

misma. Si bien esta proteína carece de péptido señal para su liberación mediante las vías de exportación conocidas, existen evidencias de un sistema de transporte alternativo que no involucra el camino clásico de secreción de proteínas (Wiedmann, 1994; Yoeman, 1993). Este factor, al igual que el PDGF y el TGF β se almacena en los gránulos α de las plaquetas (Brunner, 1993). Una característica importante de la familia de los FGF es su capacidad de asociación a la matriz extracelular por la unión a heparina y heparan sulfatos (Saksela, 1988; Rapraeger, 1991). El heparan sulfato protege al bFGF de la degradación proteolítica y aumenta su afinidad por el receptor (Kiefer, 1990). Esto hace que la citoquina esté disponible para ser liberada por enzimas como heparinasas, catepsinas D o collagenasas que son liberadas en el sitio de injuria, por lo tanto la matriz extracelular se comporta como un sitio de almacenamiento (Bennett, 1993).

Por inmunofluorescencia se determinó que los megacariocitos son la fuente principal de este factor en los pacientes con MMM y se lo encontró aumentado tanto en plaquetas como en megacariocitos de estos pacientes (Martyre, 1997). En células CD34+ también se observó un aumento del ARN mensajero del bFGF y de su receptor (Le Bousse-Kerdiles, 1996).

Trombocitemia Esencial

La trombocitemia esencial, como los otros síndromes mieloproliferativos, se origina a nivel de una célula primitiva pluripotencial (Raskind, 1985), aunque estudios recientes sugieren que el evento de transformación podría ocurrir en

diferentes estadios de diferenciación de esta célula primitiva e incluso, algunos pacientes podrían tener hematopoyesis policlonal (Jaussen, 1990; Turhan, 1992; El-Kassar, 1997; Harrison, 1997). No se han encontrado genes específicos causantes de la enfermedad y son poco frecuentes las anormalidades citogenéticas (Gugliotta, 1997).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza de acuerdo a los criterios del Grupo de Estudio de la Policitemia Vera (PVSG), por exclusión de otros síndromes mieloproliferativos, mielodisplasias y trombocitosis reactiva (Murphy, 1997; Gale, 1999). Los criterios diagnósticos propuestos por este grupo son los siguientes:

- Recuento plaquetario $>600.000/\mu\text{l}$.
- Hematocrito <40 , o masa globular normal (hombres $<36\text{ml/kg}$, mujeres $<32\text{ml/kg}$).
- Hierro de depósito en médula ósea normal o ferritina en suero normal o volumen corpuscular medio de glóbulos rojos normal.
- Cromosoma *Philadelphia* negativo o rearreglo bcr/abl génico ausente.

- Fibrosis colágena medular:
 - A. ausente
 - B. menor de 1/3 del área de la biopsia, sin esplenomegalia marcada ni reacción leucoeritroblástica.
- Sin evidencia citogenética o morfológica de síndrome mielodisplásico.
- Sin causa de trombocitosis reactiva.

La TE se caracteriza por aumento de la proliferación del linaje megacariocítico con aumento de plaquetas en circulación (Murphy, 1986). Las células de la médula ósea no presentan el cromosoma *Philadelphia*, si bien en algunos casos se halló la translocación bcr/abl, esto no parece tener significado clínico (Blickstein, 1997; Heller, 2001). En la médula ósea se observa aumento del número de megacariocitos de mayor tamaño que los normales e hiperlobulados (Thiele, 2000). En algunos casos el examen de la médula puede presentar fibrosis reticular leve.

La mayoría de los pacientes con trombocitemia esencial son asintomáticos (Tefferi, 2001a) o tienen manifestaciones relacionadas con alteraciones de la microcirculación como eritromelalgia, acromelalgia, vértigo, cefaleas y trastornos transitorios de la visión (Kurzrock, 1991; Michiels, 1990, 1993; Jabaily, 1983). Algunos pacientes pueden presentar eventos trombóticos o hemorrágicos

(Hehlmann, 1988; Fenaux, 1990). La función plaquetaria puede estar alterada, responden en forma normal o disminuida a los agonistas comunmente utilizados en estudios de agregación plaquetaria y pueden presentar agregación espontánea (Leoncini, 1990). La disfunción más frecuente es la disminución o ausencia de agregación plaquetaria en respuesta a la epinefrina (Kaywin, 1978) atribuida a la disminución del número de receptores α_2 -adrenérgicos de baja afinidad (Swart, 1984). Otros defectos frecuentes son la disminución de la agregación con ADP y colágeno y disminución del contenido intraplaquetario de ADP, serotonina y PDGF entre otras moléculas (Baker, 1988; Leoncini, 1990; Baglin, 1988). En nuestro laboratorio, en 44 pacientes con TE se encontró disminución de la agregación plaquetaria a la epinefrina y al ADP en el 70% y el 45% de los casos respectivamente; agregación espontánea en 20 pacientes; disminución de la liberación de ATP en el 56% (Laguna, 1996; 1997). Wehmeier y col demostraron que las anormalidades en el funcionamiento plaquetario no tienen relación con las complicaciones trombóticas ni hemorrágicas (Wehmeier, 1997a).

Aún no se ha establecido con claridad el rol de las citoquinas y factores de crecimiento relacionados con la hematopoyesis en la proliferación de megacariocitos en esta enfermedad. Han y col, demostraron el crecimiento espontáneo de colonias megacariocíticas de sangre periférica o médula ósea aún en medios de cultivos libres de suero y sin la presencia de células accesorias capaces de sintetizar citoquinas (Han, 1987; Kobayashi, 1993; Taksin, 1999). Las colonias tienen aumento del tamaño, desarrollo endomitótico anormal y son

hipersensibles a la trombopoyetina (Mazur, 1988; Axelrad, 2000). La trombopoyetina (Tpo) es una citoquina involucrada en la regulación del desarrollo de los megacariocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Kaushansky, 1995). Tahara y col. (1996), así como Usuki y col. (1997) hallaron aumento del nivel plasmático de esta citoquina en algunos pacientes con TE. Estos autores también demostraron su efecto potenciador sobre la activación plaquetaria inducida por diferentes agonistas. En nuestro laboratorio se encontró aumento de IL-3 plasmática en el 20% de los pacientes, en cambio la IL-6, IL-11, SCF y GM-CSF se encontraron normales (Marta, 1998).

En la trombocitemia esencial, los estudios realizados para determinar la importancia de factores de crecimiento como el PDGF, el TGF β y el bFGF son escasos. En ellos se demostró que el PDGF se encuentra elevado en el plasma de los pacientes (Gersuk, 1989) y disminuido a nivel intraplaquetario (Katoh, 1988). El TGF β intraplaquetario se encontró normal (Zalui, 1993) y no se evaluó su nivel plasmático, en tanto que el bFGF se encontró elevado en el plasma (Wehmeier, 1997).

En los pacientes con esta enfermedad se ha descrito, además, la presencia de plaquetas activadas en sangre periférica por la medición de proteínas como el factor plaquetario 4, β -tromboglobulina y PDGF (Cortelazzo, 1981; Gersuk, 1989).

Tratamiento de los pacientes

La expectativa de vida de los pacientes con trombocitemia esencial con recuento plaquetario normalizado por el tratamiento es similar a la de la población normal (Rozman, 1991) y la tasa de transformación a leucemia aguda o mielofibrosis con metaplasia mieloide es entre 1 y 5% (Tefferi, 2001 b; Fenaux, 1990; Besses, 1999). Sin embargo, los pacientes con esta enfermedad tienen un incremento en el riesgo de trombosis (Cortelazzo, 1990). Los pacientes de más de 60 años y aquellos con complicaciones trombóticas previas son considerados pacientes de alto riesgo y la disminución del recuento plaquetario a menos de 600000/ μ l disminuye el riesgo de trombosis (Cortelazzo, 1990; Barbui, 1996; Cortelazzo, 1995). Sin embargo, Regev y col (1997) hallaron complicaciones trombóticas aún con cifras de plaquetas cercanas a valores normales.

Los tratamientos están dirigidos a reducir la morbilidad y prevenir las complicaciones trombóticas (Cortelazzo, 1990; Tefferi, 1995). Los agentes alquilantes y la radiación ionizante (P^{32}) pueden ser efectivos, pero aumentan el riesgo de transformación a leucemia aguda (Berk, 1981). El interferon- α se utiliza también para disminuir el recuento plaquetario pero su utilización a largo plazo puede inducir el desarrollo de enfermedades autoinmunes y con frecuencia su uso debe ser discontinuado debido a su intolerancia (Conlon, 1990; Burman, 1986; Akard, 1986; McLaughlin, 1985). La hidroxiaurea es un agente mielosupresor de uso frecuente en enfermedades mieloproliferativas, pero es potencialmente

leucemogénico (Donovan, 1984). Por este motivo, el anagrelide surge como una nueva posibilidad de tratamiento.

Anagrelide

El anagrelide es un derivado de imidazoquinazolina que inhibe la enzima adenina monofosfato fosfodiesterasa cíclica y la fosfolipasa A2 (Gillespie, 1988; Spencer, 1994). Su efecto provoca la disminución del número de plaquetas y no se observó acción a nivel del ADN (Silverstein, 1988). Inicialmente, por su actividad anti-adenina monofosfato fosfodiesterasa cíclica, fue utilizado para inhibir la agregación plaquetaria pero en dosis más elevadas que las utilizadas actualmente para el tratamiento de los pacientes con TE. Con las dosis utilizadas para la disminución del recuento plaquetario no se observaron anormalidades en la función plaquetaria (Balduini, 1992). Se cree que actúa directamente sobre la serie megacariocítica sin afectar otras líneas celulares de la médula ósea ya que no se observó inhibición de la formación de colonias eritroides ni granulocito-macrofágicas de médula ósea (Silverstein, 1988; Andes, 1984). Si bien no se conoce el mecanismo de acción, se sabe que el anagrelide no actúa acortando la vida media de las plaquetas (Solberg, 1989), sino que su mecanismo es a través de la inhibición de la maduración del megacariocito dado que actúa disminuyendo su tamaño y ploidía (Mazur, 1992). Recientemente se ha observado una reducción del número de megacariocitos en la médula ósea basado en la comparación del número de megacariocitos con el recuento de progenitores eritroides nucleados (Tomer, 2002). Como consecuencia de la acción de la droga se produce una

disminución del recuento plaquetario de manera dosis dependiente, aunque la respuesta es variable en cada paciente.

El anagrelide es, actualmente, una droga de elección en el tratamiento de pacientes jóvenes con TE dado que no es mutagénica y no tiene efecto leucemogénico a diferencia de los otros tratamientos mencionados.

1.2 MEGACARIOCITOS Y PLAQUETAS

Como ya se mencionó, la línea celular afectada en la trombocitemia esencial es la megacariocítica. La alteración en esta serie celular lleva a un incremento del recuento plaquetario en circulación.

En la formación de la plaqueta participan principalmente 2 procesos: la megacariocitopoyesis y la trombopoyesis.

1.2.1 *Megacariocitos*

Los megacariocitos son células hematopoyéticas con capacidad para producir plaquetas (Stenberg, 1989), se caracterizan por su gran tamaño y citoplasma abundante, encontrándose en la médula ósea en baja frecuencia (0.02-0.05% de la población de células nucleadas) (Harker, 1968).

La megacariocitopoyesis comienza con una célula hematopoyética primitiva pluripotencial que se compromete a un linaje, prolifera y se diferencia.

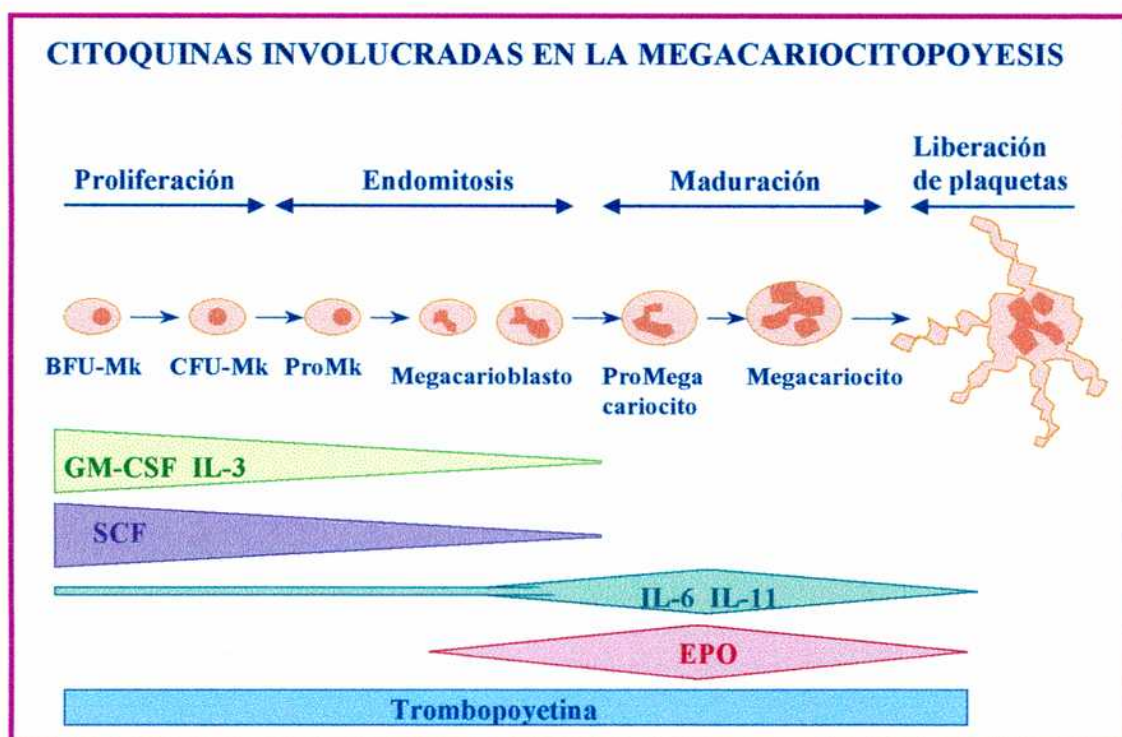
Durante la etapa proliferativa la célula progenitora se diferencia y atraviesa por tres estadios: unidad formadora *burst* de megacariocitos (BFU-MK), unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-MK) y unidad formadora de colonias megacariocíticas de baja densidad (LD-CFU-MK). Cada estadio se caracteriza por la expresión de determinados antígenos de membrana que permiten una identificación más precisa.

El último estadio celular del desarrollo de la serie es el megacariocito. Su maduración incluye un proceso de endomitosis, con repetidos ciclos de duplicación nuclear sin división celular hasta que alcanza una ploidía de 32N, 64N y/o 128N, donde la célula aumenta su citoplasma, dando lugar a células de gran tamaño y de múltiples núcleos.

En la megacariocitopoyesis participan una serie de factores de crecimiento. Los principales reguladores positivos son: trombopoyetina, *Stem cell factor* (SCF), IL-3, IL-6, IL-11 (Nichol, 1995; Avraham, 1992; Debili, 1993; Carrington, 1991; Asano, 1990; Neben, 1993). Además participan otros factores como el GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocito-macrofágicas), factor inhibidor de leucemia (LIF), eritropoyetina y factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (Ishibashi, 1987; Han, 1992). En este proceso participan también reguladores negativos: factor plaquetario 4, β -tromboglobulina y TGF β (Han, 1990; Kuter, 1992). El TGF β 1 es el inhibidor mas potente de la megacariocitopoyesis. Sin embargo, estudios realizados por Bursucker y col (1992)

indican que este factor de crecimiento puede actuar como inhibidor o estimulador según el estadio celular de los progenitores hematopoyéticos.

El proceso final de la megacariocitopoyesis es la trombopoyesis, proceso por el cual los megacariocitos maduros forman y liberan plaquetas en circulación (Behnke, 1968). Este proceso de generación de la plaqueta requiere la formación de extensiones citoplasmáticas del megacariocito que se fragmentan en sitios preestablecidos, liberando fragmentos citoplasmáticos de medida variable a la circulación (proplaquetas) (Thiery, 1956 a y b). En este proceso también participan factores de crecimiento como IL-3, IL-6, eritropoyetina, IL-11, SCF (Carrington, 1992; Ishibashi, 1989; An, 1994; Neben, 1993; Debili, 1993; Avraham, 1992). Los reguladores negativos son también el factor plaquetario 4, TGF β y óxido nítrico (Han, 1991; Kuter, 1992).



1.2.2 Plaquetas

Las plaquetas fueron identificadas como elementos pequeños en circulación, son discos biconvexos de 2-3 micrones de diámetro. Al no poseer núcleo no tiene capacidad proliferativa. El principal sitio de formación de plaquetas es la médula ósea, si bien los megacariocitos que quedan retenidos en la microcirculación pulmonar pueden actuar también como una fuente plaquetaria importante (Trowbridge, 1982; Martín, 1991). El número de plaquetas en circulación es de 150.000 a 450.000 por $10^9/L$. Permanecen en la sangre periférica entre 8 y 12 días siendo eliminadas principalmente en el bazo por las células del sistema mononuclear-fagocítico.



PLAQUETAS EN REPOSO

El papel funcional más importante de las plaquetas es en la hemostasia. Participan en este mecanismo a través de su adherencia a la pared vascular en sitios de injuria, formación de agregados plaquetarios amplificados por la liberación de sustancias pro-agregantes, prevención del sangrado inicial, iniciación de la coagulación por la liberación de sustancias pro-coagulantes y exposición de fosfolípidos de superficie para la generación de trombina (Baumgartner, 1976; Mac Intyre, 1976; Holmsen, 1975; Cohen, 1973). También participan en la reparación de tejidos mediante la liberación de factores de crecimiento (Gimbrone, 1969; Niewiarowski, 1981). Para cumplir este proceso las plaquetas atraviesan por tres fases principales, la adhesión primaria al subendotelio, activación con liberación del contenido granular y la agregación a otras plaquetas (ver más adelante). Desde el punto de vista funcional la plaqueta se puede dividir en cinco partes: la membrana, el citoesqueleto, sus gránulos, el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso.

•*Membrana:*

La membrana externa de la plaqueta está compuesta por fosfolípidos, proteínas y glicoproteínas. La cara interna está enriquecida en fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina. El contenido de colesterol y la relación de ácidos grasos saturados e insaturados entre los componentes fosfolipídicos son importantes en la fluidez de la membrana plasmática (Schick, 1986). La membrana contiene, además, una serie de

glicoproteínas (GP) que son receptores celulares importantes en su relación con los vasos sanguíneos, con otras plaquetas y otras células.

Las principales glicoproteínas son las siguientes:

GP IIb IIIa: es receptor para fibrinógeno y para factor von Willebrand (sustancias fundamentales en la adhesión de la plaqueta al endotelio) (Phillips, 1988). Es la glicoproteína de mayor relevancia en la funcionalidad plaquetaria y el complejo más abundante en la membrana de éstas. La activación de este complejo ocurre por la exposición de la plaqueta a colágeno, factor von Willebrand (FvW), trombina, ADP y/o tromboxano, requiere calcio y es necesaria para la unión a diferentes proteínas adhesivas como fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand y vitronectina. La unión de fibrinógeno lleva a la agregación plaquetaria, en cambio mediante la unión de fibronectina o factor von Willebrand participa de la adhesión de las plaquetas al subendotelio. Este complejo participa también en los eventos de transducción de señal.

Complejo GPIIb/IX/V: es receptor para el factor von Willebrand (Nurden, 1987). Tiene un rol crítico en el estado primario de la interacción de la plaqueta con el subendotelio expuesto deteniendo y anclando a la plaqueta al mismo. La interacción es esencial cuando la adhesión se realiza bajo las condiciones de alto *shear stress* en la microcirculación (Roth, 1991). Esta interacción activa las plaquetas desencadenando cambios del citoesqueleto que controlan el cambio de forma, *spreading*, secreción, agregación y contracción plaquetaria (Kroll, 1996; Ruggeri, 1997; Andrews, 1998).

GPIIb/IIIa y GPIV: son receptores para colágeno (Pischel, 1988; Santoro, 1988), participan en la adhesión y la agregación plaquetaria.

La ausencia y anomalías de estas proteínas conducen a enfermedades hemorrágicas.

GLICOPROTEINA	RECEPTOR DE	FUNCIÓN
Ib/IIIa	Fibrinógeno, FvW	Agregación/Adhesión
Ib/IX/V	Von Willebrand	Adhesión plaquetaria temprana
Ia/IIa	Colágeno	Adhesión/Agregación plaquetaria
IV	Colágeno	Adhesión/Agregación plaquetaria

Además de estas glicoproteínas, las plaquetas tienen otros receptores para agonistas que estimulan o inhiben la función plaquetaria. Entre los receptores para agonistas estimuladores de la función se encuentran los de ADP, tromboxano A₂, factor activador plaquetario (PAF), trombina y epinefrina. También se encuentran receptores para agonistas inhibidores como prostaciclina, prostaglandina D₂ (PGD₂) y adenosina.

•Citoesqueleto plaquetario

Adyacente a la membrana plasmática se encuentra el citoesqueleto formado por filamentos cortos de actina entrecruzados por proteínas de unión a

actina y conectado a la membrana plasmática principalmente por el complejo GPIb/IX/V (Fox, 1987) y la GPIIb/IIIa. El citoesqueleto cumple numerosas funciones incluyendo estabilización de la membrana lipídica, regulación del complejo GPIb/IX/V, regulación de la forma de la membrana plasmática y posee una banda de microtúbulos, formada principalmente por tubulina polimerizada, que sirven para mantener la forma discoide de la plaqueta en estado de reposo (While, 1971).

•*Gránulos intraplaquetarios:*

La plaqueta posee tres tipos de gránulos: α , densos y gamma. Los gránulos α contienen moléculas adhesivas, citoquinas, factores de coagulación (V y VIII), IgG y factores de crecimiento (Harrison, 1993). Entre las moléculas adhesivas presentes en estos gránulos se encuentran el fibrinógeno, fibronectina y trombospondina que tienen un rol en la consolidación del trombo plaquetario que se forma en el sitio de injuria. Estos gránulos tienen además, factor plaquetario 4, β -tromboglobulina, factor von Willebrand, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Blockmans, 1995), factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Estos factores son secretados después de la activación plaquetaria y participan en la reparación de la lesión. Los gránulos densos contienen serotonina, calcio, ADP y ATP. Finalmente, los gránulos gamma poseen enzimas lisosomales como hidrolasas ácidas, catepsina, colagenasa, prolactasa y elastasa y factores de permeabilidad

vascular. Estos gránulos son liberados durante la activación plaquetaria y tienen una participación importante en la lisis del coágulo y *clearing* del trombo plaquetario (van Oost, 1986) .

- *Sistema canalicular abierto:*

Se denomina así a la invaginación de la membrana plasmática de la plaqueta. Este sistema sirve como un conducto al cual los gránulos de almacenamiento intracelular se fusionan y permite la descarga posterior de los mismos en la reacción de liberación, después de la activación plaquetaria. Además es un reservorio de membrana para facilitar la extensión (*spreading*) de la plaqueta y formación de pseudópodos después de la adhesión y es un reservorio de glicoproteínas de membrana que aumentan sobre la superficie plaquetaria después de la activación (Suzuki, 1992).

- *Sistema tubular denso:*

El sistema tubular denso es equivalente al retículo endoplasmático liso de otras células. Es el principal lugar de secuestro de calcio y serotonina, y donde se localizan las enzimas que participan en la síntesis de prostaglandinas y de ATP (Culter, 1978; Stabland, 1969).

Función plaquetaria

Las plaquetas tienen tres funciones básicas: adhesión al tejido subendotelial cuando el vaso es injuriado, activación que lleva a liberación de su contenido granular (función secretora) y agregación entre si para formar un trombo hemostático (hemostasia primaria).

La estructura vascular está compuesta de tal forma que impide el contacto de los elementos de la sangre con el subendotelio vascular, una superficie altamente trombógena. Cuando por algún mecanismo se produce una alteración del endotelio, que permite establecer un contacto entre las plaquetas y el subendotelio, se desencadenan una serie de eventos celulares. El objetivo de este proceso es la formación del trombo hemostático.

Adhesión

La matriz subendotelial es muy rica en contenido de colágeno, factor von Willebrand, vitronectina, fibronectina, laminina, proteoglicanos y otras proteínas. Ante un daño vascular, el colágeno de la pared queda expuesto y la plaqueta se adhiere a él por interacción con su receptor, el complejo Ia/IIa y la GPIV; este es el estímulo inicial para la activación de la plaqueta in vivo (Gerrard, 1988). Por otra parte el factor von Willebrand se une a su receptor en las plaquetas, la GPIb/IX/V y al subendotelio para asistir al proceso adhesivo (Nurden, 1987; Ruggeri, 1993 a). Este factor es esencial para la unión de la plaqueta a la fibra de

colágeno del subendotelio (Stel, 1985). El complejo IIbIIIa también tiene una participación importante, pero este complejo requiere una activación previa para ejercer su función adhesiva.

Activación

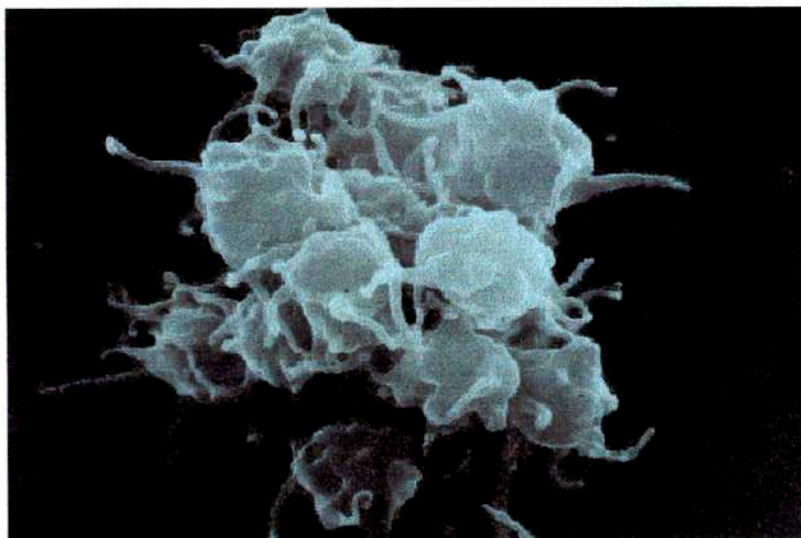
La primera manifestación de la activación plaquetaria se caracteriza por un cambio en su forma, pierde la forma discoide y pasa a ser redondeada. Esto es seguido por dos procesos: la emisión de pseudópodos, que aumenta el contacto plaqueta-plaqueta y puede ayudar a la estabilización del trombo en formación y la centralización de las organelas intracelulares (Carroll, 1982). Después de la activación, las plaquetas inician un proceso físico-químico que finaliza en la liberación de las sustancias almacenadas en sus gránulos. La velocidad e intensidad de esta respuesta está condicionada por los umbrales de activación de los diferentes agonistas.

Inductores débiles como bajas concentraciones de ADP y adrenalina, sólo provocan la liberación de proteínas almacenadas en los gránulos α ; concentraciones altas de estos agonistas o bajas de colágeno producen, además del efecto mencionado, la liberación del contenido de los gránulos densos. Estímulos más fuertes como altas concentraciones de colágeno o trombina causan también la salida del contenido enzimático de los lisosomas.

En el proceso de exocitosis del contenido granular la membrana del gránulo se une a la membrana plaquetaria, por lo tanto las proteínas de la cara

interna de la membrana del gránulo se expresan sobre la superficie externa de la membrana de la plaqueta y quedan expuestas proteínas de adhesión como la P-selectina, CD62 y CD63 (p53) (McEver, 1984; Stenberg, 1985). Para que este proceso ocurra, es importante la formación de tromboxano A2 (ver más adelante).

La liberación del contenido granular es crítica para el reclutamiento de plaquetas circulantes, para formar el trombo y para la subsiguiente estabilización del agregado plaquetario.



PLAQUETAS ACTIVADAS
Cambio de forma y emisión de pseudópodos

Agregación

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas activadas por colágeno y otros agonistas como trombina exponen proteínas adhesivas sobre su superficie y

liberan mediadores como ADP y tromboxano A₂, para estimular plaquetas circulantes adicionales (Seiss, 1989). En presencia de las proteínas adhesivas las plaquetas circulantes se unen a las ancladas al subendotelio para formar el trombo o agregado plaquetario. La agregación ocurre por la formación de puentes de fibrinógeno entre moléculas de la GPIIb/IIIa de plaquetas adyacentes. Esto requiere la activación previa de la plaqueta, que induce un cambio conformacional de la glicoproteína exponiendo el sitio de unión a fibrinógeno (Blockmans, 1995).

Como ya se mencionó, la superficie plaquetaria contiene receptores para diferentes agonistas que pueden desencadenar la agregación, moléculas que pueden encontrarse en el lugar de la lesión vascular. Sustancias como trombina, ADP, epinefrina y colágeno pueden alcanzar concentraciones elevadas en zonas de injuria, siendo por ello candidatas fisiológicas de primer orden para la activación plaquetaria.

La agregación plaquetaria in vivo es dependiente del *shear stress* (fuerza de zizallamiento). Con *shear stress* alto, como ocurre en arterias estenóticas y en la microcirculación, la adhesión y la agregación plaquetaria es muy dependiente de factor von Willebrand que interactúa con la GPIb. La unión del FvW a la GPIb lleva a la apertura de canales transmembrana de calcio, aumento en los niveles de calcio citoplasmáticos y cambio conformacional en la GPIIb/IIIa, que así puede unir fibrinógeno formando puentes entre las plaquetas adyacentes. En esta situación, el FvW es responsable de la activación y la agregación plaquetaria. En condiciones de bajo *shear stress*, como en las arterias no estenóticas o en las

venas, es más importante el rol de activadores plaquetarios como fibrinógeno y fibronectina en la formación de los puentes intraplaquetarios. Esta situación es similar a los estudios de agregación *in vitro* (Ruggeri, 1993 b).

Inhibición de la activación plaquetaria

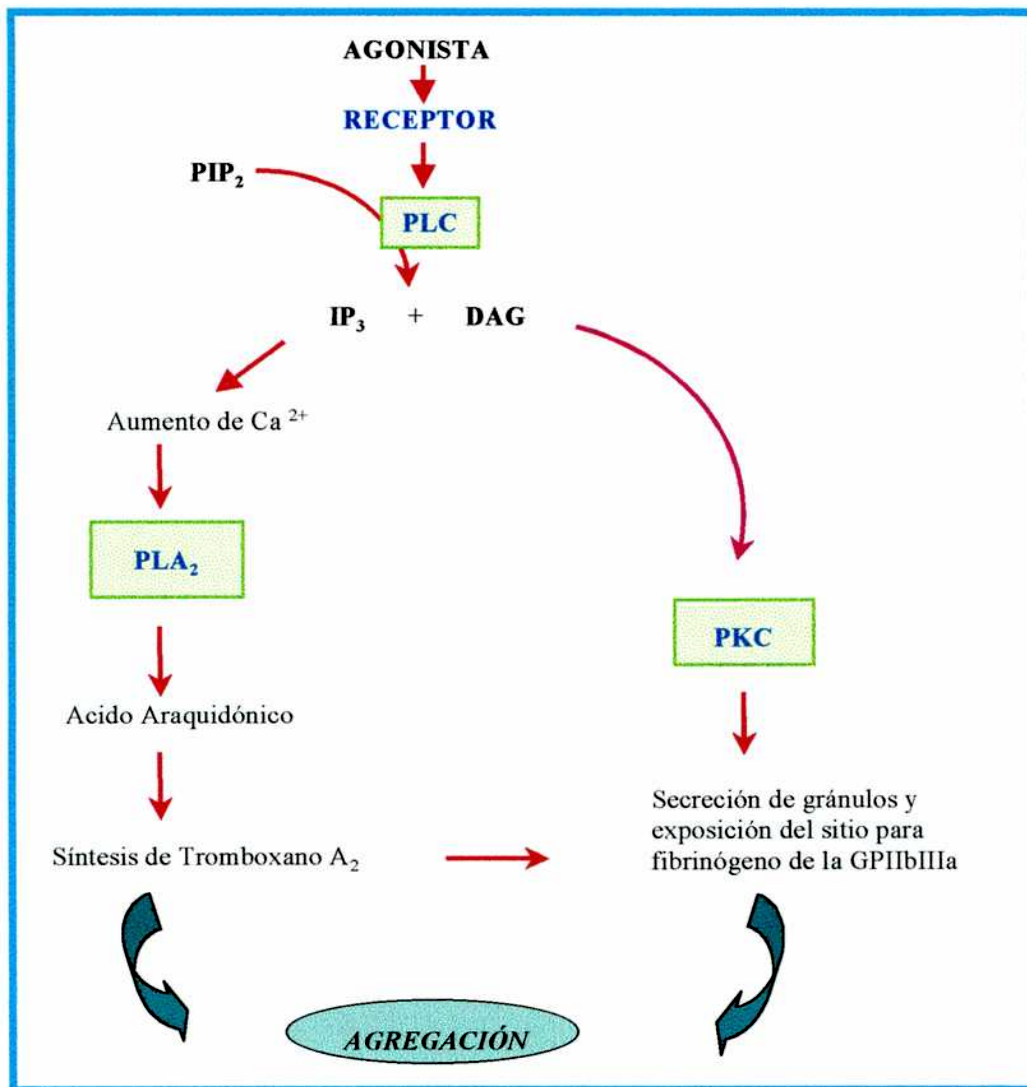
La activación plaquetaria está controlada por dos vías inhibitorias: la del AMP cíclico que es la más importante y la del GMP cíclico. Como se mencionó anteriormente, la prostaciclina (PGI_2), la prostaglandina D_2 (PGD_2) y la adenosina inhiben la agregación plaquetaria, mediante el aumento de la concentración intracelular de AMPc (Aktories, 1985). El óxido nítrico, liberado por las células endoteliales, inhibe la respuesta plaquetaria a través del aumento del GMP cíclico (Radomski, 1987).

Agregación plaquetaria in vitro

La función plaquetaria in vitro se estudia por el método desarrollado por Born (1962) que mide la transmisión de luz en un agregómetro. Esto permite la medición de la agregación plaquetaria en respuesta a los agonistas por medio de la observación de variaciones en la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra (ver materiales y metodos). Los agonistas utilizados comúnmente para estudiar la agregación son: ADP, ácido araquidónico, colágeno y epinefrina; sustancias que se encuentran normalmente en la circulación y en la pared vascular.

La agregación requiere la presencia de cationes divalentes y fibrinógeno en el medio. Por este mecanismo se estudia la funcionalidad de las plaquetas y su capacidad de respuesta ante diferentes estímulos.

Los mayoría de los agonistas utilizan un camino común para inducir la agregación plaquetaria, esto se resume en el siguiente esquema:



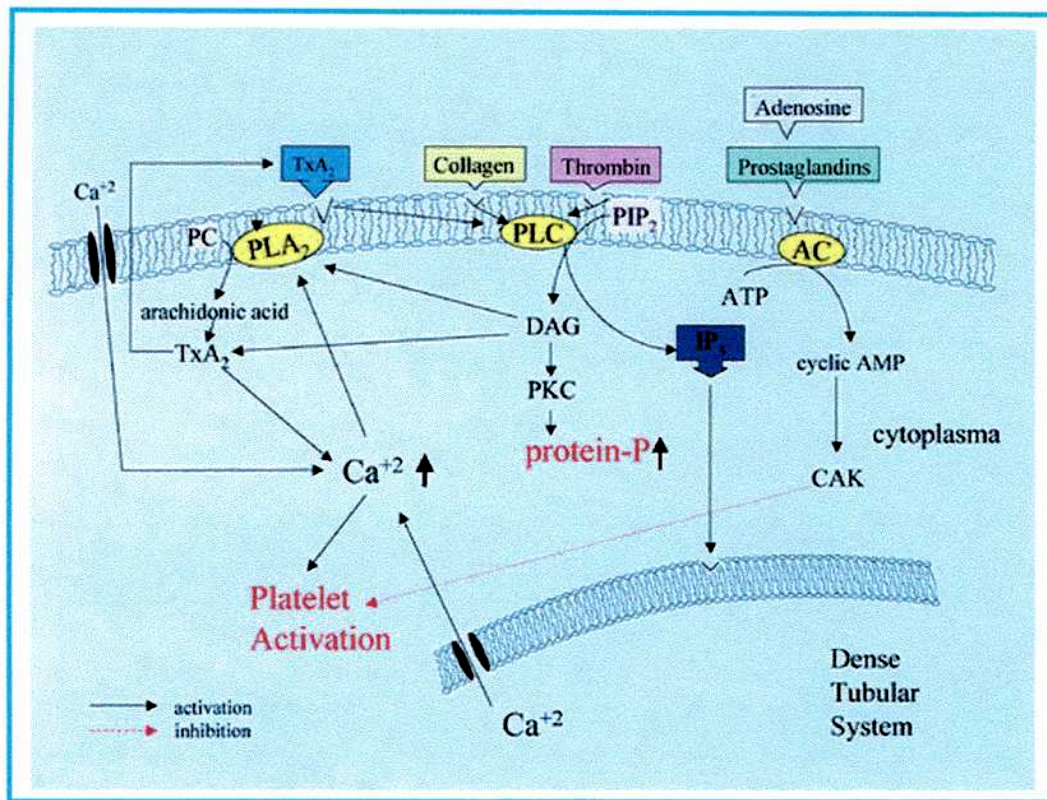
Esquema general de la agregación plaquetaria

Los agonistas fuertes generalmente estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos, aumento de calcio citosólico libre, formación de tromboxano A₂ y la activación de la PKC. El ADP es un agonista débil que causa cambio de forma, secreción granular y agregación, estimula mínimamente la hidrólisis de fosfoinosítidos o la activación de la PKC, pero induce la formación de tromboxano A₂, sugiriendo que su receptor está unido a la PLA₂ y no a la PLC.

Señales intraplaquetarias que llevan a la activación

La transducción de señales en plaquetas es un mecanismo complejo que se inicia cuando un receptor interactúa con su agonista y resulta en las respuestas celulares mencionadas anteriormente. Este proceso está mediado por la generación de segundos mensajeros en el que están involucradas cascadas de activación de fosfatasa y quinasas y que desencadenan respuestas específicas, dependiendo de la señal primaria. Aún no se conoce con exactitud la totalidad de las proteínas que se fosforilan durante el proceso.

La respuesta que desencadena la mayoría de los agonistas a los receptores ocurre a través de la activación de proteínas ligadoras de GTP (proteínas G), que activan una proteína quinasa que a su vez actúa sobre el citoesqueleto induciendo el cambio de forma. Las proteínas G participan, además, en la regulación de la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂ y la adenilato ciclasa, enzimas asociadas con la agregación plaquetaria.

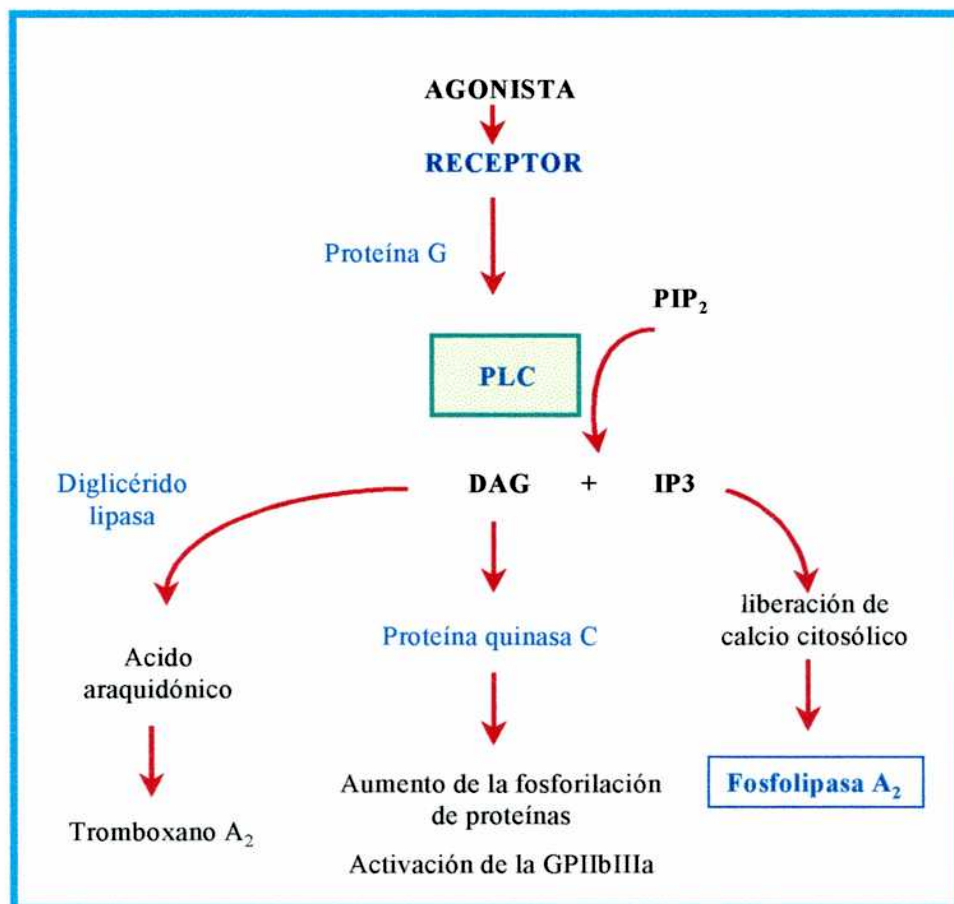


Activación a través de los diferentes receptores y segundos mensajeros.

Fosfolipasa C:

La activación de la fosfolipasa C es inducida por agonistas como trombina, colágeno, epinefrina, PAF, serotonina y tromboxano A₂ (Blockmans, 1995). En las plaquetas activadas, esta enzima induce la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP₂) de la membrana, llevando así a la formación de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a sus receptores específicos en el sistema tubular denso y libera el calcio almacenado al citosol (Seiss, 1989), lo

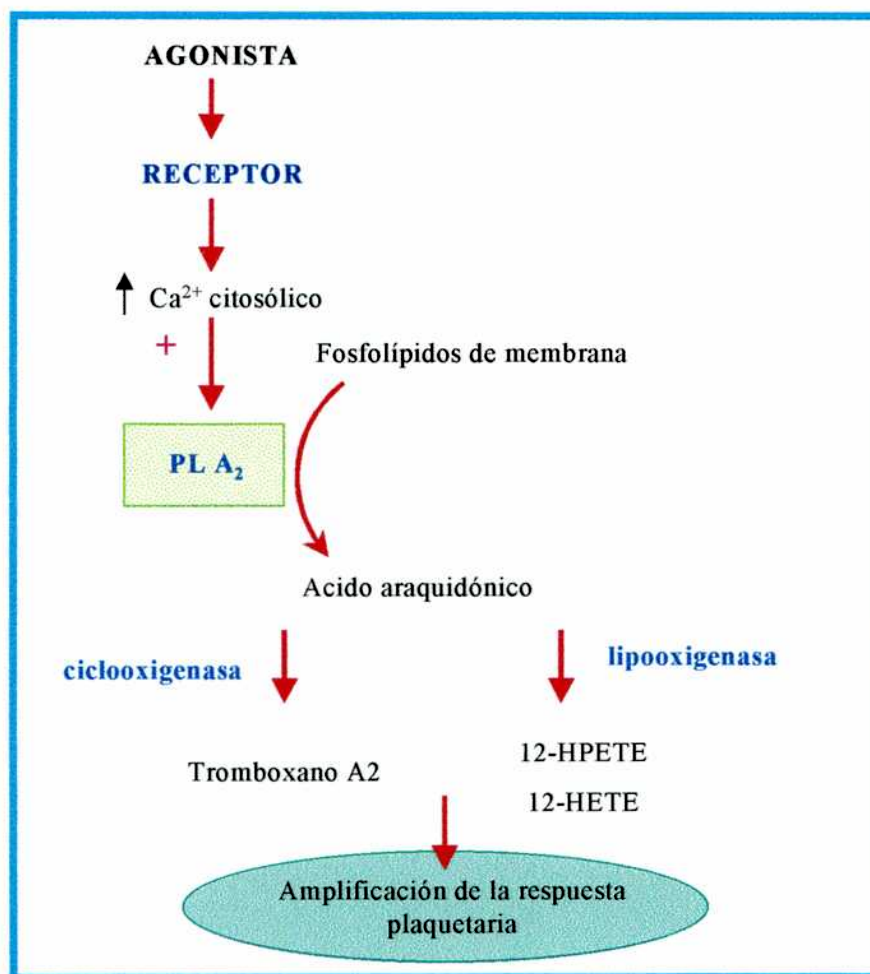
cual lleva a un incremento en la actividad metabólica de la plaqueta y activación de la enzima fosfolipasa A₂. El DAG activa la proteína quinasa C que produce a su vez una cascada de fosforilaciones de proteínas que inducen, finalmente, el proceso de contracción celular. A su vez el DAG es degradado por la enzima diglicérido lipasa para liberar ácido araquidónico que es metabolizado a tromboxano A₂ y conduce a la amplificación de la activación plaquetaria. El AMP y GMP cíclico inhiben la actividad de la enzima fosfolipasa C.



Transducción de señales a partir de la activación de la fosfolipasa C

Fosfolipasa A₂:

La fosfolipasa A₂ es activada por agonistas como el ADP, cliva de la membrana lipídica (principalmente a partir de fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) ácido araquidónico (Mahadevappa, 1986) que es metabolizado por la ciclooxigenasa y por la lipooxigenasa. La ciclooxigenasa induce la formación de tromboxano A₂ y la lipooxigenasa genera principalmente ácido 12-hidroxiperoxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico (12-HPETE) y ácido 12-hidroxi-5,8,10,14 eicosatetraenoico (12-HETE). El tromboxano A₂, como se mencionó anteriormente, es un potente agente agregante necesario para la amplificación de la respuesta plaquetaria, estimula la incorporación de plaquetas hacia el trombo plaquetario en formación y media la agregación secundaria observada *in vitro*. La función del 12-HPETE y del 12-HETE en la hemostasia no se conoce claramente, pero se sabe que el 12-HETE tiene una actividad quimiotáctica débil que puede tener un rol en la aparición de neutrofilos en el sitio de injuria (Marcus, 1993). La fosfolipasa A₂ se inhibe con el aumento de AMP cíclico y en forma indirecta por la disminución de la concentración de calcio citoplasmático libre.



Transducción de señales a partir de la activación de la fosfolipasa A₂

Adenilato ciclasa:

La adenilato ciclasa utiliza ATP para formar AMP cíclico. La activación de esta enzima tiene un efecto importante en la fisiología de la plaqueta ya que el aumento de AMPc inhibe todas las respuestas causadas por agonistas como trombina, colágeno, epinefrina, tromboxano A₂ y factor activador plaquetario (PAF). La mayoría de los agonistas plaquetarios suprimen la formación del AMPc

por la inhibición de esta enzima. Inhibidores de la agregación plaquetaria como la prostaglandina E1 y D2 activan receptores de membrana acoplados a la adenilato ciclasa aumentando el AMPc.

Fosforilación de proteínas

Como se mencionó anteriormente, durante los procesos de activación y agregación plaquetaria descritos se activan un gran número de proteínas tirosina quinasas entre ellas miembros de la familia Src y se fosforila un gran número de proteínas plaquetarias, la mayoría todavía no identificadas. La fosforilación de proteínas y el sistema mencionado anteriormente (generación de inositol fosfato, y diacilglicerol que lleva a un incremento del calcio citosólico y la activación de la PKC) están cercanamente relacionados (Rendu, 1991). Se ha descrito la relación entre las proteínas fosforiladas en tirosinas, la activación de la GPIIb/IIIa y reorganización del citoesqueleto (Elmore, 1990) así como también con el sistema de transducción de señales intracelular, la elevación de calcio, la activación de la PKC o la elevación del AMP cíclico. Se sabe, además, que existe una relación con los diferentes pasos de la agregación, reflejando diferentes estados de activación (Bachelot, 1992) y con la liberación del contenido granular (Rendu, 1991).

Por lo tanto, activadores fisiológicos causan la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas plaquetarias. El patrón de las proteínas que se fosforilan durante la agregación plaquetaria es diferente dependiendo de la potencia del

agonista utilizado. En las plaquetas en reposo se observan algunas proteínas fosforiladas y durante la activación por el agonista algunas proteínas se mantienen fosforiladas, otras se fosforilan más intensamente y también se observa la fosforilación de proteínas nuevas (Bachelot, 1992). (El patrón de activación se describe en resultados)

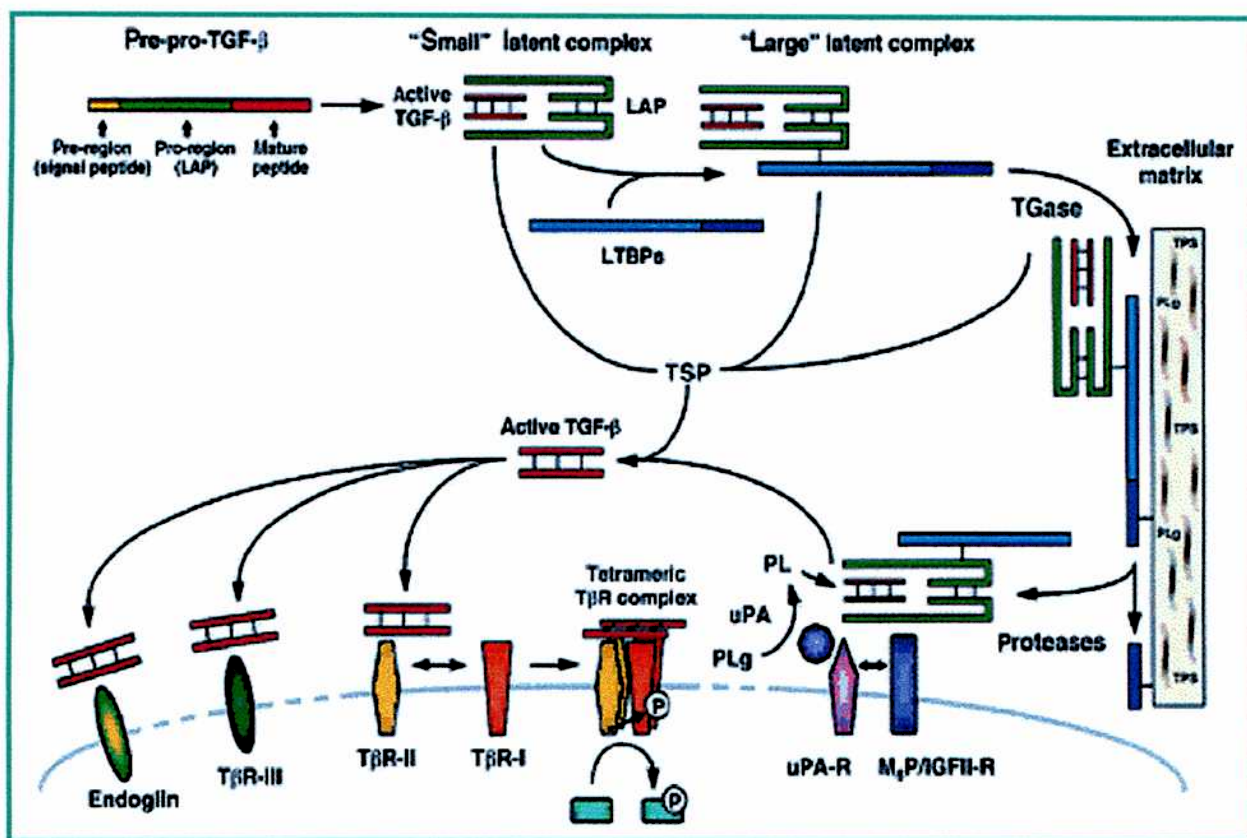
1.3 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE

Como mencionamos anteriormente, el TGF β se encuentra involucrado en diversos procesos biológicos, entre ellos el desarrollo de fibrosis, la inhibición de la proliferación de algunos tipos celulares como la serie hematopoyética e inducción de la proliferación de otras células como los fibroblastos. Por lo tanto, resulta necesario conocer su mecanismo de acción para comprender mejor la diversidad de las respuestas que desencadena.

1.3.1 Estructura del TGF β

El TGF β se sintetiza como una molécula precursora y se procesa proteolíticamente por endoproteasas en el aparato de golgi, de donde sale como una molécula madura unida en forma no covalente a una proteína asociada a la latencia (LAP) que previene la unión al receptor (Munger, 1997). Este complejo

se llama complejo latente pequeño y es mas estable que la molécula bioactiva. A este complejo se le puede asociar una proteína de unión al TGF β latente (LTBP) que se une a través de LAP. Las LTBP aumentan la secreción y estabilidad del complejo pequeño, aseguran el *folding* correcto del TGF y lo dirigen a la matriz extracelular para su almacenamiento o a la superficie celular donde es activado (Munger, 1997; Tapiale, 1997). La activación del complejo es por un clivaje que puede ser llevado a cabo por enzimas como trombospondina (activador principal), plasmina, calpaina, transglutaminasa, metaloproteasas de la superficie celular como MM2 y MM9, por la unión de LAP a receptores de tipo manosa 6 fosfato, acidificación del microambiente celular, especies reactivas de oxígeno (generadas por irradiación) y tratamiento por drogas como antiestrógenos, retinoides, vitamina D, y glucocorticoides (Munger, 1997; Tapiale, 1997; Barcellos-Hoff, 1996; Jullien, 1989; Crawford, 1998).



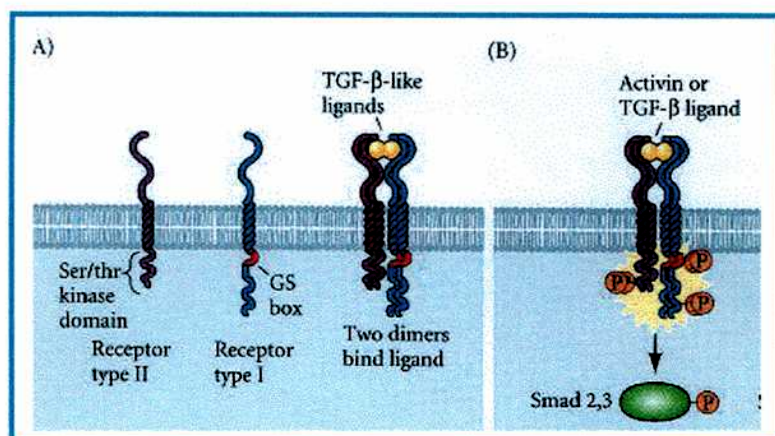
Estructura del TGF-β: estructura, latencia y activación. LAP, péptido asociado a la latencia; LTBP, proteína de unión a TGF-β latente; M6P/IGFII-R, receptores manosa-6-fosfato/typo II insulina-like growth factor; PLg, plasminógeno; PL, plasmina; TGase, transglutaminasa; TβR-I, -II, -III, TGF-β receptor tipo I, II, III; TSP, trombospodina; uPA, urokinasa activadora del plasminógeno; y uPA-R, receptor uPA. (Fortunel, 2000)

1.3.2 Receptores del TGFβ

Los receptores del TGFβ fueron identificados sobre la superficie de la mayoría de las células examinadas. Se han descrito nueve tipos diferentes de

receptores (Massague, 1992) que unen los distintos miembros de la familia del TGF β (mencionados anteriormente) con diferente afinidad. Dos de ellos, el de tipo I y el de tipo II, son glicoproteínas de 53 y 73-95 kd respectivamente. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores serina/treonina quinasa y tienen mayor afinidad para TGF β 1 que para TGF β 2 o β 3 (Chiefetz, 1987). Un tercer tipo de receptor, el tipo III o betaglicano, es un proteoglicano de membrana de 200-400 kd que une β 1 y β 2 con igual afinidad (Segarini, 1988). Los receptores de tipo I y II están involucrados en la transducción de la señal inducida por el TGF β , el de tipo II es esencial para la unión del ligando mientras que el de tipo I lo es para la transducción de la señal al núcleo. El receptor de tipo III regula el acceso de la citoquina a los receptores señalizantes (Sankar, 1995). Ante la unión del TGF β , los receptores de tipo I y II forman un complejo junto con la citoquina, el receptor tipo II que se encuentra fosforilado en forma constitutiva en residuos serinas, se autofosforila en forma ligando dependiente también en este tipo de residuos y fosforila al receptor tipo I en residuos serina/treonina en la región GS (Wrana, 1992, 1994; Luo, 1997). Este último, que posee actividad de serina/treonina quinasa es el que finalmente realiza la transducción de la señal *down stream* fosforilando proteínas específicas. Por lo tanto, el receptor tipo I es el que determina la especificidad de la señal intracelular inducida por diferentes miembros de la familia del TGF β . Existen diferentes isoformas de estos dos receptores por lo que la interacción entre ellos resulta en una amplia variedad de

respuesta dependiendo del tipo celular y de la cantidad relativa de subunidades de cada receptor (Massague, 1994).



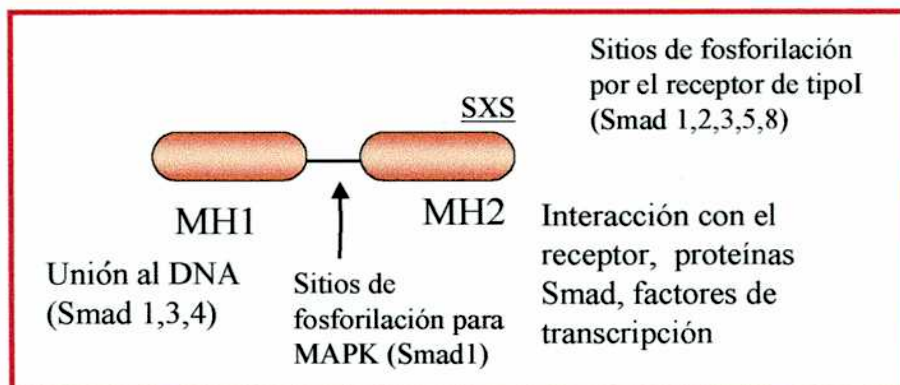
Receptores del TGF β . A) Formación del complejo por la unión del ligando. B) El receptor tipo II fosforila al tipo I en residuos serina o treonina específicos en la región GS. El receptor tipo I activado puede fosforilar proteínas Smad y transducir la señal río abajo.

Como se mencionó anteriormente el TGF β induce diferentes tipos de señales, por lo tanto activa distintas vías de transducción de señales al núcleo, entre ellas la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP-Quinasas) y la vía de las proteínas Smad. Esta última es la mejor estudiada en la actualidad para esta citoquina.

1.3.3 Transducción de señales inducidas por TGF β

Vía de las proteínas Smad

Se han descrito 9 proteínas Smad diferentes cuyos pesos moleculares se encuentran entre 42 y 60 kd. Estas proteínas poseen una estructura común formada por dos dominios de homología llamados MH1 (dominio N-terminal), que media la unión al DNA y MH2 (dominio C-terminal) que tiene actividad transcripcional y es responsable de la asociación con otras proteínas Smad o factores de transcripción. Estos dominios están conectados por una región rica en prolinas que, en las Smad activadas por receptor, posee sitios consenso de fosforilación para MAPK y son responsables del *crosstalk* entre las vías de las Smad y la de las MAPK (Mulder, 2000; Yue, 1999). En su estado inactivo, el dominio MH1 de la proteína se une al MH2 para inhibir la actividad transcripcional.



Estructura de la proteína Smad

Estas proteínas se pueden agrupar según su función en transductoras de señal, llamadas activadoras de receptor (R-Smad 1,2,3,5,8 y 9); mediadora (Co-Smad 4) e inhibidoras (I-Smad 6 y 7) (Heldin, 1997).

Las proteínas Smad activadoras de receptor se pueden dividir en dos grupos: las Smad 2 y 3 que median las señales del TGF β y de receptores de activina (Nakao, 1997 a) y las Smad 1, 5, 8 y 9 que median señales de receptores de proteínas morfogénicas medulares (BMP), también pertenecientes a la familia del TGF β (Hoodless, 1996; Nishimura, 1998; Chen, 1997; Watanabe, 1997). En algunos tipos celulares se observó que la señal inducida por TGF β puede ser mediada también por Smad1 (en células de cancer de mama) y Smad 5 (en células hematopoyéticas) (Liu, 1998; Bruno, 1998). La fosforilación de estas proteínas es dependiente del ligando (Zhang, 1997).

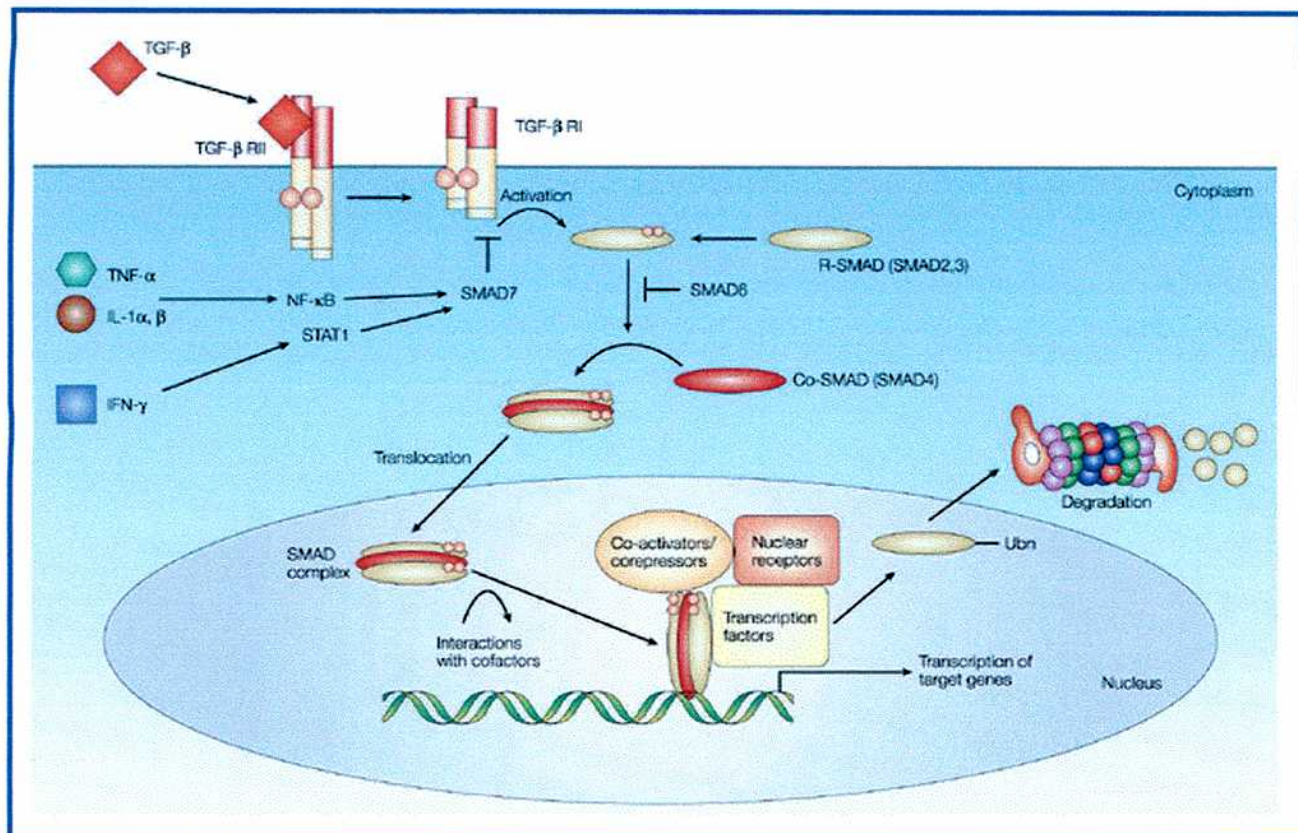
El modelo de señalización que se propone es que una R-Smad se une al receptor quinasa tipo I (RI) y es fosforilada en dos serinas por éste (Souchelnytskyi, 1997; Abdollah, 1997). Esta unión es promovida por la acción de SARA (*Smad anchor for receptor activation*), una proteína que se une al RI activado e interactúa directamente con Smad 2 y 3 facilitando el acceso de éstas al receptor (Tsukazaki, 1998; ten Dijke, 1998). Cuando la R-Smad se fosforila se produce un cambio conformacional en la proteína, se disocia del complejo y se asocia a Smad 4, formando un complejo heteromérico que se transloca al núcleo donde regula la transcripción génica.

Una vez en el núcleo, el complejo puede unirse directamente al ADN o interactuar con proteínas de unión al mismo (Lagna, 1996; Yingling, 1997; Zawel, 1998).

La unión de Smad al ADN mediada por su dominio MHI es de baja afinidad y no selectiva, la formación de un complejo Smad-ADN de alta afinidad y selectiva requiere la participación de otros factores de unión al ADN (Shi, 1998). El conjunto de proteínas (coactivadores, correpresores, factores de transcripción) con las que se encuentran las Smad en el núcleo, que dependen del tipo y estado celular, determina el tipo de respuesta. (Massagué, 2000).

En el mecanismo de transducción de señales a través de la vía de las Smad, las señales convergen en la proteína Smad 4 y algunos autores sugieren que la convergencia de múltiples señales a una sola proteína puede servir para modular el *crosstalk* entre los diferentes receptores de la familia del TGF β y controlar la intensidad de la respuesta por la competencia por una cantidad limitada de Smad 4 (Candia, 1997).

Las proteínas Smads inhibitorias funcionan como un feedback negativo para terminar o reducir la fuerza de la señal, pueden asociarse con el receptor tipo I activado y prevenir la fosforilación y translocación nuclear de las Smad activadoras de receptor o unirse a la proteína R-Smad e inhibir la transducción de la señal (Hayashi, 1997; Imamura, 1997; Nakao, 1997 b; Hata, 1998).



Transducción de señales a través de las proteínas Smad, regulación y activación de la transcripción. El complejo de activación formado por el ligando y los receptores tipo I y tipo II permite que el receptor tipo I se active y fosforile a la proteína R-Smad. R-Smad fosforilada se asocia con Smad 4 y transloca al núcleo donde puede unirse a factores de transcripción y coactivadores para facilitar la transcripción génica o a correpresores que la inhiben. (*Nature Reviews Cancer*, 2002)

Vía de las MAPK

Las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) son quinasas serina/treonina que requieren una doble fosforilación en residuos treonina y tirosina para ser activadas en respuesta a una gran variedad de estímulos

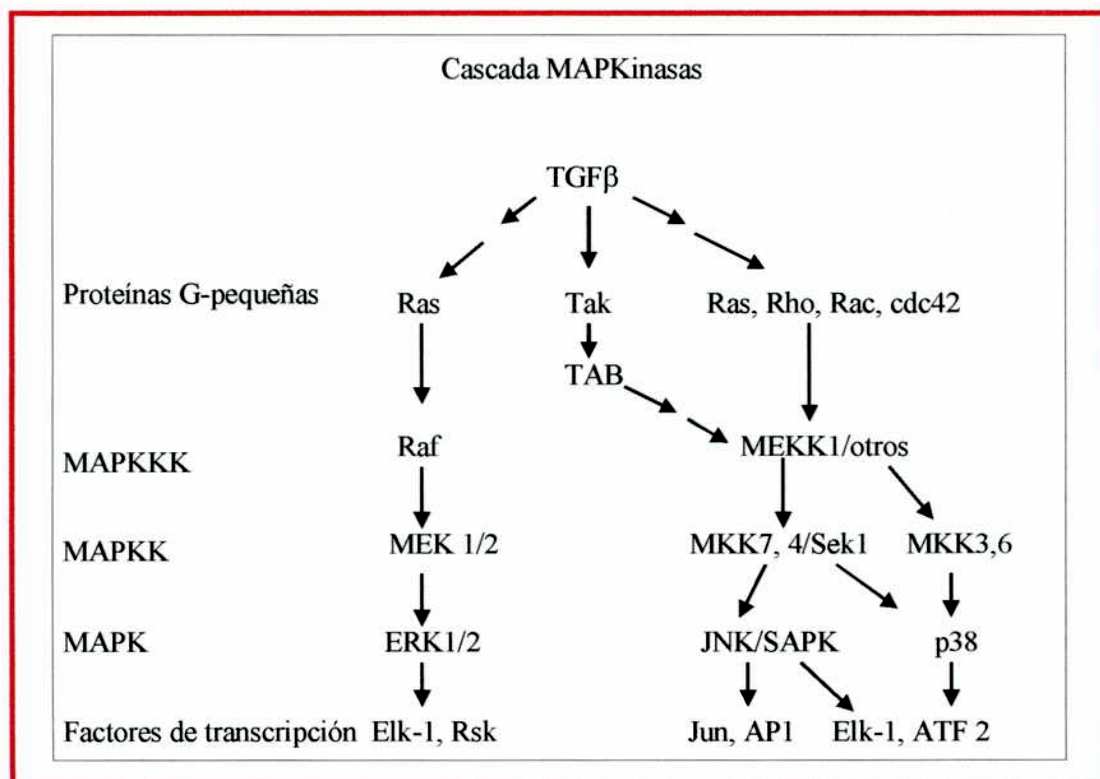
extracelulares (Davis, 1998, Kyriakis, 1998). Son importantes en la transducción de las señales para la regulación el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y respuestas celulares a estrés ambiental. Su *target* principal es el factor AP-1 (*activator protein-1*) (Whitmarsh, 1996).

En células de mamíferos fueron identificados tres grupos de MAPKs: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las quinasas c-Jun N terminal/ proteína quinasa activada por estrés (JNKs/SAPKs) y p38 (Davis, 1998; Kyriakis, 1998). Los tres grupos son mediadores de la transducción de la señal desde la superficie celular hacia el núcleo. En la vía de transducción de señal, las MAPK pueden ser activadas por una MAPK quinasa que son activadas por quinasas serina/treonina llamadas MAPKK quinasas. Proteínas G de bajo peso molecular como las Ras, Rac y RhoA pueden activar a las MAPKKKs (Kyriakis, 1998). Aunque las MAPK pueden fosforilar diferentes proteínas, algunos de sus *targets* principales son factores de transcripción que después de ser fosforilados por ellas se unen al promotor de ciertos genes para inducir la transcripción génica (Whitmarsh, 1996).

El TGF β pueden activar los tres tipos de MAPK en varios tipos celulares (Hartsough, 1997; Ravanti, 1999; Yue, 2001). En células epiteliales se vió que la activación de la vía RAS/ERK tiene un rol crítico en la señalización por TGF. La activación de esta vía y de la vía JNKs/SAPKs ocurre entre 3-10 minutos después del tratamiento con la citoquina (Mulder, 1992; Hartsough, 1995; Frey, 1997). La activación de estas quinasas por TGF β es importante en las señales que llevan a la

inducción de la síntesis de TGF β 1 por TGF β 3 (SAPKs y ERKs), inhibición del crecimiento celular (Ras/MAPK) y la síntesis de fibronectina (SAPK/JNK) (Yue 2000; Hartsough, 1996; Hocevar, 1999).

Las ERKs son activadas principalmente por las proteínas Ras pero también pueden ser activadas por la proteína quinasa C y AMPc (Burgering, 1993; Marquardt, 1994). Pueden fosforilar, además de factores de transcripción y proteínas citoplasmáticas como la fosfolipasa A2 (enzima importante en la activación plaquetaria) (Lenormand, 1993). Están involucradas entre otras cosas en la proliferación de fibroblastos (Mulcahy, 1985).



Activación de MAPKs inducida por TGF β

Crosstalk entre Ras/MAPK y Smad

Como se mencionó anteriormente, las proteínas R-Smad tienen sitios consenso para la fosforilación por MAPK. Por lo tanto la señal de las Smad puede ser modulada también por otros caminos de señalización como RAS/MAPK. La actividad de la Smad2 puede ser regulada positivamente por MEKK1, una MAPKKK, la fosforilación de Smad2 por esta quinasa aumenta la interacción Smad2/Smad4 y la translocación nuclear, llevando a un aumento en la actividad transcripcional de Smad2 (Brown, 1999). También se observó que la vía Ras/MEK/ERK es requerida parcialmente para la activación de Smad1 por TGF β (Yue, 1999 a y b) y que la activación de las SAPK/JNK por el TGF β puede llevar a la fosforilación de Smad3 que aumenta la translocación nuclear de la proteína y su actividad transcripcional (Engel, 1999).

OBJETIVOS

En este trabajo nos propusimos:

- Evaluar en plasma y en plaquetas los niveles de tres factores de crecimiento involucrados en el desarrollo de fibrosis medular, el PDGF, el TGF β y el bFGF en la trombocitemia esencial y su relación con la fibrosis reticulínica medular.
- Determinar los niveles de estas citoquinas cuando los pacientes alcanzan un recuento plaquetario normal por el tratamiento con anagrelide y compararlos con los niveles iniciales.
- Determinar los niveles del ARN mensajero del PDGF, TGF β y del bFGF.
- Determinar la participación de linfocitos y megacariocitos en la producción del TGF β y el bFGF en sangre periférica de los pacientes con trombocitemia esencial.
- Estudiar la función del TGF β sobre plaquetas normales. Para esto se evaluó lo siguiente:
 - Si las plaquetas expresan receptores para el TGF β .
 - El efecto del TGF β sobre la función plaquetaria.
 - La participación del TGF β en la activación de proteínas plaquetarias por fosforilación en residuos tirosina.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos estudiados

Se incluyeron en el estudio 34 pacientes con trombocitemia esencial (TE) con una edad promedio de 47 años (15-78) (mediana y rango). El diagnóstico de la enfermedad se estableció de acuerdo a los criterios, ya mencionados anteriormente, del Grupo de Estudio de la Policitemia Vera (PVSG) (Murphy, 1997) que incluye la ausencia del cromosoma Philadelphia y del rearrreglo cromosómico bcr/abl además de fibrosis colágena medular ausente o limitada a menos de un tercio del área de la biopsia medular estudiada y hematocrito igual o menor de 40%. Once de los 34 pacientes mostraron fibrosis reticulínica leve en el estudio de la biopsia medular. Los pacientes se trataron con una imidazoquinazolina (anagrelide hydrochloride) (Agrylin, Roberts Pharmaceuticals, Eatontown, NJ, USA), droga utilizada para reducir el recuento plaquetario. El tratamiento se inició entre 5 y 75 meses después del diagnóstico. Los pacientes se estudiaron antes y durante la remisión hematológica por el tratamiento. La muestra obtenida durante la remisión se extrajo luego de un tiempo no inferior a los dos meses del tratamiento (2-12 meses), cuando el recuento plaquetario permaneció estable y dentro del rango normal. La mediana del recuento plaquetario antes del tratamiento fue de 896000 plaquetas/ μ l (520000-2100000) y durante el mismo 290000 plaquetas/ μ l (240000-554000). Simultáneamente se estudió un grupo de 31 controles normales, con una mediana de 34 años de edad (26-62) y 249000 plaquetas/ μ l (188000-379000). Para efectuar

estos estudios se solicitó el consentimiento por escrito de los pacientes y de los controles normales. Este proyecto fue autorizado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.

Muestras de sangre

La sangre se obtuvo por un procedimiento de doble jeringa con aguja de tipo mariposa, para evitar la activación plaquetaria. Tanto los pacientes como los controles no tomaron aspirina ni ninguna otra droga que afecte el funcionamiento plaquetario durante los 10 días previos a la extracción de la muestra.

Metodología

Cuantificación proteica

Preparación del plasma pobre en plaquetas

La sangre se anticoaguló con citrato trisódico 3.8% en una proporción 9:1 (v/v). El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo inmediatamente después de la extracción por dos centrifugaciones sucesivas, primero a 1800g durante 15 minutos (Beckman TJ-6, USA), luego se separó el plasma de la muestra y se centrifugó nuevamente a 12000g por 5 minutos en una micro centrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Todos los procedimientos se llevaron a cabo a

temperatura ambiente. Las muestras se guardaron a -70°C hasta el momento de su uso.

Preparación del plasma rico en plaquetas:

La sangre se anticoaguló con ACD-C en una proporción 9:1 (v/v). El plasma rico en plaquetas (PRP) se preparó por centrifugación de la muestra a 150g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperaron los dos tercios superiores del plasma enriquecido en plaquetas teniendo cuidado de no agitar el paquete de células de la parte inferior, para evitar la contaminación con leucocitos y glóbulos rojos.

Preparación del lisado plaquetario

El plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de la manera descrita se centrifugó a 900g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener un *pellet* plaquetario, luego las plaquetas se lavaron dos veces con solución de Hanks (ver soluciones) que contiene, además, citrato trisódico 3,8%, adenosina 1mM y teofilina 2mM para inhibir la activación plaquetaria. Finalmente el número de plaquetas se ajustó a 1×10^9 /ml y las muestras se guardaron a -70°C hasta su utilización. El recuento plaquetario se efectuó por medio de un contador electrónico (Analizador AcT diff, Coulter corporation, USA). Previamente a la medición de las citoquinas las plaquetas se lisaron por sonicación (Fisher, NY, USA) durante 30 segundos y se centrifugaron 10 minutos a 10000g.

Cuantificación proteica de las citoquinas PDGF AB, TGF β ₁ y bFGF

Los niveles proteicos de estas citoquinas se analizaron en el PPP y en las plaquetas por un inmunoensayo enzimático (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) utilizando equipos comerciales (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Las mediciones se realizaron según las recomendaciones de la empresa comercial que los produce. Brevemente, la muestra se incubó durante el periodo de tiempo recomendado (que varía según la citoquina a determinar) en la placa que posee el primer anticuerpo específico para la citoquina de interés, luego se lavó la placa 3 veces con solución de lavado, se agregó el segundo anticuerpo, también específico para la citoquina, conjugado a peroxidasa de rabanito y se incubó nuevamente durante el tiempo recomendado. A continuación se lavó la placa 3 veces con solución de lavado, se incubó durante 20 minutos con el sustrato, un cromógeno, tetrametilbenzidina junto con una solución de peróxido de hidrógeno para obtener un producto coloreado cuya intensidad es dependiente de la cantidad de proteína de la muestra unida a la placa. Finalmente la reacción se detuvo con una solución de ácido sulfúrico 2N. La placa se leyó en un lector de ELISA (microplate reader 450, Bio-rad) a 450nm dentro de los 30 minutos de detenida la reacción.

Para cuantificar el TGF β ₁ total en el plasma, fue necesario activar previamente el TGF β ₁ latente por incubación de la muestra durante 10 minutos con una solución ácida de urea 10M y ácido acético 2.5N y su posterior

neutralización con una solución de NaOH 2.7N/ Hepes 1M. Para medir las proteínas plasmáticas se realizaron diluciones de forma que las determinaciones estuvieran dentro del rango de detección del equipo. En el caso del PDGF la dilución utilizada fue 1/10 y para el TGF β 1/3. La muestra para medir el bFGF se utilizó sin diluir.

La cuantificación del TGF β_1 total intraplaquetario se realizó mediante la activación previa de la muestra como en el caso anterior. Para medir las proteínas intraplaquetarias también se realizaron diluciones. En el caso del PDGF la dilución del lisado plaquetario utilizada fue 1/120; para el TGF β 1/360 y para el bFGF 1/5.

La concentración final de cada muestra se obtuvo a partir de una curva estándar realizada con la proteína recombinante de cada citoquina. Cada muestra se analizó por duplicado y los resultados se calcularon como el promedio de las lecturas (en todos los casos fueron reproducibles). El límite de detección para PDGF, TGF β_1 y bFGF es de 84 pg/ml, 7 pg/ml y 1 pg/ml, respectivamente.

Como control de las condiciones de extracción de las muestras y de su preparación se realizó la cuantificación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) utilizando los mismos equipos comerciales (R&D), siguiendo la técnica antes descrita y las recomendaciones de la empresa y se obtuvieron resultados en los pacientes dentro de los valores normales.

RT-PCR semicuantitativa

Preparación del ARN mensajero

El nivel de expresión de PDGF, TGF β y bFGF se estudió por RT-PCR. Para obtener la suspensión plaquetaria, el PRP se preparó a partir de sangre anticoagulada en ACD-C (9:1 v/v) y se siguió el procedimiento antes mencionado. El PRP se centrifugó nuevamente a 150g durante 5 minutos y se filtró (filtros Pall, Purecell PL, NY, USA) para eliminar los leucocitos contaminantes, se fraccionó para obtener 4×10^9 plaquetas totales y se centrifugó para obtener un pellet plaquetario. Con esta técnica se obtiene una contaminación menor de 1 leucocito cada 100000 plaquetas. El ARN total se extrajo a partir del pellet por medio del reactivo TRIZOL (Gibco BRL, NY, USA) con el método de Chomczynski y Sacchi. (1987)

Trascripción reversa

Síntesis de la primer cadena.

La primera cadena de ADN complementario se sintetizó utilizando el equipo comercial Superscript Preamplification System (Gibco BRL). Para esto a 1 μ g de ARN se le agregó 50ng de hexameros al azar, se completó el volumen a 12 μ l con agua-DEPC y se incubó durante 10 minutos a 70°C y posteriormente 1 minuto en hielo. Luego se agregó buffer de PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), MgCl₂ 25mM, 10mM de cada dNTP, DTT 0.1 M y se incubó durante 5

minutos a 25°C. Después de agregar 200 unidades de la enzima SuperScript II RT se incubó la reacción durante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C y 1 min en hielo. Finalmente se agregó 2 unidades de RNasa H de E. Coli, se incubó 20 minutos a 37°C y se guardó la muestra a -20°C hasta su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La semicuantificación de la expresión del gen de PDGF, TGF β y bFGF se realizó por la co-amplificación y normalización con un gen control interno de expresión constitutiva. Los genes utilizados como control fueron β_2 microglobulina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) según el caso.

Se realizaron experimentos preliminares para determinar las condiciones en que el cDNA de cada citoquina es amplificado en la región lineal de la curva de la reacción de la PCR.

Semicuantificación de PDGF

La semicuantificación del nivel de ARN mensajero del PDGF se realizó por su coamplificación y normalización con el ARNm GAPDH como control interno. La secuencia nucleotídica de los primers utilizados es la siguiente:

Para PDGF: *upstream*: 5'-CCTGACGTATTCCACCT-3', *downstream*: 5'-CTGGAGATAGACTCCGT-3', dando un producto de 336 pb.

Para GAPDH: *upstream*: 5'-TGCACCACCAACTGCTT-3', *downstream*: 5'-TACTCCTTGGAGGCCAT-3', dando un producto de 554 pb.

La PCR se realizó en un termociclador automático (Biometra UNO-Thermoblock, BIOTRON, Alemania). La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: se utilizaron diluciones seriadas del cDNA (de 1/20 a 1/160) obtenido a partir de 1 µg de ARN, primers *upstream* y *downstream* de PDGF, 1 µM; primers *upstream* y *downstream* de GAPDH, 1 µM; 200 µM de cada dNTP (GIBCO), 1.2 U de Taq DNA polimerasa (GIBCO), 10 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ en un volumen final de 25 µl.

Ciclo de amplificación:

Después del paso inicial de desnaturalización de las cadenas de ADN por incubación durante 5 minutos a 94°C, el programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 94°C durante 1 min., *aniling* a 56°C durante 1 min. y extensión durante 1 min. a 72°C. Este proceso se realizó por 29 ciclos. (ver tabla). Finalmente se realizó un paso de extensión durante 5 min a 72°C. El control negativo de la reacción se realizó omitiendo la incorporación de cDNA en el tubo.

Semicuantificación de TGFβ

La semicuantificación del nivel de ARN mensajero de TGFβ se realizó por su coamplificación y normalización con el ARNm de β₂ microglobulina como control interno. La secuencia nucleotídica de los primers utilizados es la siguiente:

Para TGF β : *upstream*: 5'-TAAAAGTGGAGCAGCACGTG-3', *downstream*: 5'-GAACCCGTTGATGTCCACTT-3' dando un producto de 233 pb.

Para β_2 microglobulina: *upstream*: 5'-AAAGATGAGTATGCCTGCCG-3', *downstream*: 5'-ACTCAATCCAAATGCGGC-3' dando un producto de 120 pb.

La PCR se realizó de la forma antes mencionada con algunas modificaciones: se utilizaron diluciones seriadas del cDNA de 1/4 a 1/32 obtenido a partir de 1 μ g de ARN, 0.5 μ M de primers *upstream* y *downstream* para TGF β , 0.4 μ M de primers *upstream* y *downstream* para β_2 microglobulina, 250 μ M de cada dNTP (GIBCO), 1.25 U de Taq DNA polimerasa (GIBCO), 10 x PCR buffer, 1.7 mM MgCl₂ en un volumen final de 25 μ l. Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, el ciclo de amplificación fue el siguiente: 94°C 50 seg, 57°C 50 seg, 72°C 20 seg, 33 ciclos de amplificación y finalmente, 72° 5 min (ver tabla). El control negativo de la reacción se realizó omitiendo la incorporación de cDNA en el tubo.

Semicuantificación de bFGF

La semiquantificación del nivel de ARN mensajero del bFGF se realizó por su coamplificación y normalización con el gen de GAPDH como control interno. La secuencia nucleotídica de los primers utilizados es la siguiente:

Para bFGF: *upstream*: 5'-AAGAGCGACCCTCACATCAA-3', *downstream*: 5'-TGCCACATACCAACTGGTGT-3' dando un producto de 216 pb.

La PCR se realizó de la forma antes mencionada con algunas modificaciones: se utilizaron diluciones seriadas del cDNA de 1/4 a 1/32 obtenido a partir de 1µg de ARN, 1 µM de primers *upstream* y *downstream* para bFGF, 0.1µM para GAPDH y 1.4 mM MgCl₂. El ciclo de amplificación fue similar al utilizado para el TGFβ, pero en este caso la temperatura de *aniling* fue 59°C (el ciclo realizado fue: 94°C 50 seg, 59°C 50 seg, 72°C 20 seg, 33 ciclos de amplificación y 5 min a 72°C) (ver tabla). El control negativo de la reacción se realizó omitiendo la incorporación de cDNA en el tubo.

PRIMERS

Producto T.anil.

PDGF	Up: 5'-CCTGACGTATTCCACCT-3'	336 pb	56°C
	Down: 5'-CTGGAGATAGACTCCGT-3'		
TGF β	Up: 5'-TAAAAGTGGAGCAGCACGTG-3'	233 pb	57°C
	Down: 5'-GAACCCGTTGATGTCCACTT-3'		
bFGF	Up: 5'-AAGAGCGACCCTCACATCAA-3'	216 pb	59°C
	Down: 5'-TGCCACATACCAACTGGTGT-3'		
β ₂ microglobulina	Up: 5'-AAAGATGAGTATGCCTGCCG-3'	120 pb	
	Down: 5'-ACTCAATCCAAATGCGGC-3'		
GAPDH	Up: 5'-TGCACCACCAACTGC'TT-3'	554 pb	
	Down: 5'-TACTCCTTGGAGGCCAT-3'		

Visualización del resultado de la amplificación

Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando diluciones seriadas del templado para obtener la región lineal de amplificación y la cuantificación se realizó en la mayor dilución donde ambos productos fueron visibles y sin observar saturación de la amplificación con respecto al punto anterior.

La visualización del producto de la amplificación se realizó por electroforesis, en un gel de agarosa al 2%, a 100 volts en solución TAE. Se reveló con bromuro de etidio y se visualizó por transiluminación (Mini-transilluminator, Bio-Rad) con luz ultravioleta. El gel se fotografió con una cámara polaroid (Polaroid DS 34). La cuantificación se realizó por densitometría (Imaging Densitometer, BIO-RAD model GS-670), evaluando el área de la banda del producto de amplificación del gen de interés y la del gen de control interno y obteniendo la relación entre ellas.

Immunofluorescencia de células mononucleares

Preparación de las células

La sangre se anticoaguló con citrato trisódico 3,8% en una proporción 9:1 (v/v) y se sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/ml) (Histopaque, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) para separar las células mononucleares que quedan en una interfase de baja densidad, de las células granulocíticas y los glóbulos rojos que quedan en el fondo del tubo. El gradiente se centrifugó a 450g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células

mononucleares se recuperaron de la interfase de baja densidad, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en una concentración de 7.5×10^5 células/ml. La suspensión celular se citocentrifugó durante 2 minutos a 1600 rpm sobre un portaobjetos en una citocentrífuga (StatSpin Technologies, Massachusetts, USA). Las células se fijaron por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en paraformaldeído 4% en PBS, luego se lavaron los preparados con PBS y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso. Previamente a la utilización de los preparados para la marcación con los anticuerpos específicos, las células se permeabilizaron con triton X-100 0.05 % en PBS por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente y los preparados se lavaron con PBS por incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.

Inmunofluorescencia

Se realizó una doble marcación con anticuerpos específicos para identificar el tipo celular y para una de las citoquina estudiadas (TGF β o bFGF). Se utilizó un anticuerpo anti-GPIII_a (CD61) (Becton Dickinson, San Jose, USA) para identificar los megacariocitos y un anticuerpo anti-CD3 para identificar los linfocitos T (Becton Dickinson, San Jose, USA). Junto con estos anticuerpos se utilizó un anticuerpo anti-TGF β ₁ humano hecho en pollo o anti-bFGF humano hecho en cabra, (R&D). Para realizar la marcación, las células se incubaron con el anticuerpo anti-TGF β ₁ biotinilado (40 $\mu\text{g/ml}$) o con el anticuerpo anti-bFGF biotinilado (10 $\mu\text{g/ml}$) durante toda la noche a 4°C , en cámara húmeda. Se lavaron

los preparados con PBS dos veces incubándolos 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las células se incubaron con el anticuerpo CD61 conjugado a FITC (10 µg/ml) o el anticuerpo CD3 conjugado a FITC (10 µg/ml) bajo las mismas condiciones. Los preparados se lavaron nuevamente 2 veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se incubaron con el conjugado avidina-TRITC (dilución 1:200) (Sigma, St Louis, USA) durante una hora a temperatura ambiente y se lavaron 5 veces por incubaciones con PBS durante 5 minutos. La marcación inespecífica se evitó por preincubación de la muestra con IgG no específica (Becton Dickinson, San Jose, USA). Los controles negativos se realizaron reemplazando el anticuerpo primario con Igs no inmunes de la especie correspondiente (R&D). Para la visualización de las células marcadas los preparados se montaron en glicerina y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C hasta su observación. Las células se observaron y se fotografiaron por medio de un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Alemania)

Citometría de flujo

Para detectar la presencia del receptor de TGFβ en las plaquetas se utilizó la técnica de citometría de flujo. Para ello se extrajo sangre anticoagulada en ACD-C en una proporción 9:1 (v/v). Las plaquetas (PRP) se obtuvieron y se lavaron de la manera descrita anteriormente. Finalmente, se las ajustó a una concentración de 8000 plaquetas/µl (recuento en el cual la marcación observada fue máxima en una curva de concentración plaquetaria). Para la marcación de las

plaquetas se utilizó el equipo comercial Fluorokine (R&D systems) y se siguieron sus recomendaciones. Se utilizó como ligando del receptor de TGF β , la citoquina recombinante conjugada a biotina y un conjugado avidina-FITC. Como control negativo se utilizó una proteína inespecífica (inhibidor de la tripsina de soja) biotinilada en igual grado que la citoquina. Para la realización del ensayo, la muestra se incubó con la citoquina biotinilada durante 60 min a 4°C, luego se agregó el conjugado avidina-FITC y se incubó 30 min a 4°C en la oscuridad. Finalmente, se lavo la muestra 2 veces con buffer de lavado, se resuspendió en el mismo buffer y se estudió la muestra en un citómetro de flujo (Becton Dickinson). Se determinó la intensidad de fluorescencia media (Gmean) y se calculó la relación entre la Gmean del TGF β y la de la proteína inespecífica.

Agregación plaquetaria

Para determinar si el TGF β tiene algún efecto sobre el funcionamiento de las plaquetas se realizaron experimentos de agregación plaquetaria utilizando ADP como agonista y distintas concentraciones de la citoquina.

Agregación plaquetaria en PRP

La agregación plaquetaria se evaluó por el método turbidimétrico de Born, utilizando un Lumi-agregómetro (Chrono-Log Corporation). Este método se basa en la diferencia de densidad óptica entre el plasma rico y el pobre en plaquetas. A medida que las plaquetas se agregan, por la adición de un agonista, permiten el

mayor pasaje de luz disminuyendo la densidad óptica. Las plaquetas en reposo disminuyen la transmisión de la luz, el agregado de un agonista inicia el proceso de activación plaquetaria, que se puede dividir en tres fases. Primero, se observa una reducción de la transmisión de la luz debido al cambio de forma de las plaquetas y emisión de pseudopodos, este cambio se observa sólo con algunos agonistas. Segundo, comienzan a formarse pequeños agregados que permiten un incremento en la transmisión de la luz, este evento puede llegar a un *plateau*, dependiendo del agonista utilizado, en este punto la agregación es reversible y se denomina agregación primaria. Después de la agregación inicial las plaquetas liberan su contenido granular, se sintetiza tromboxano A_2 y esto actúa como estímulo para otras plaquetas llevando a una agregación irreversible que se denomina agregación secundaria o total.

Para la medición de la agregación plaquetaria, el plasma rico en plaquetas se diluyó con plasma pobre de la misma muestra para obtener una concentración de 300.000 plaquetas/ μ l. Las plaquetas se contaron en un contador electrónico. Una muestra de 450 μ l de PRP se coloca en un tubo de agregómetro con un magneto para permitir una agitación constante (la agitación es necesaria para la colisión inter-plaquetaria y para mezclar con las plaquetas el agonista agregado). La temperatura durante la agregación se mantuvo constante a 37°C.

Para estudiar la agregación plaquetaria se utilizan habitualmente diferentes agonistas, entre ellos el ADP, el ácido araquidónico y el colágeno. La concentración de ADP que produce una agregación primaria y secundaria (total)

es 2 μ M. Previamente al experimento, se induce la agregación plaquetaria con ácido araquidónico 1mM para probar la función plaquetaria mediada por ciclooxigenasa.

Para estudiar el efecto del TGF β , se probaron diferentes concentraciones de la citoquina, diferentes tiempos de incubación y por ultimo diferentes concentraciones del agonista, ADP. Para evaluar un posible efecto inhibitorio de la citoquina, el ADP se utilizó en una concentración de 2 μ M y para poder observar efectos de potenciación se utilizaron concentraciones que variaron entre 0.8 y 1.6 para inducir una agregación mínima.

El TGF β se utilizó en una concentración entre 10 y 100 ng/ml. Los tiempos de incubación fueron 0, 5 y 60 minutos a 37°C. Las agregación se realizó con y sin la presencia del agonista.

Fosforilación de proteínas

Muestra

Separación de plaquetas por gradiente de metrizamide

El plasma rico en plaquetas se obtuvo a partir de sangre anticoagulada con ACD-C según el protocolo descrito. El PRP se diluyó agregándole 50 % de buffer fosfato pH 6 (este pH evita la agregación plaquetaria) y se sembró luego sobre un gradiente de metrizamide. El gradiente se preparó colocando primero un mililitro de la solución de metrizamide 25% en buffer fosfato pH 6, sobre ella se agregó un mililitro de la solución de metrizamide 10% en el mismo buffer

cuidando que se forme la interfase. La muestra sembrada en el gradiente se centrifugó a 1500g durante 15 minutos. Se recuperó la interfase plaquetaria, eliminando la fase superior y la inferior del gradiente. Las plaquetas se resuspendieron en el mismo buffer y se repitió el procedimiento. Las plaquetas recuperadas de la forma descrita se resuspendieron en buffer fosfato pH 7.4. El recuento plaquetario se ajustó a 600.000 plaquetas/ μ l, concentración óptima para obtener una cantidad adecuada de proteínas para la realización del western blot.

Agregación de plaquetas filtradas por metrizamida

La agregación plaquetaria se realizó de forma similar a la mencionada para el caso del PRP, con algunas modificaciones. Se utilizaron 350 μ l de muestra ajustada a 600.000 plaquetas/ μ l; fue necesario la incorporación de CL_2Ca 1mM y fibrinógeno humano 45 mg/ml (necesarios para la agregación de las plaquetas). El ADP se utilizó en una concentración 10 μ M, concentración necesaria para que se produzca la agregación. En estas condiciones se requiere una concentración mayor de los agonistas para obtener una respuesta adecuada. Se incubó la muestra durante 5 y 60 min a 37°C con las mismas concentraciones de TGF β utilizadas para la agregación con PRP.

La agregación se interrumpió un minuto después de iniciada para obtener el nivel máximo de fosforilación de proteínas. La reacción se detuvo por la agregación de 50 μ l de SDS 20% e inhibidores enzimáticos: PMSF 1mM y aprotinina (1 μ g/ml) (inhibidores de serinoproteasas), EDTA 1mM (inhibidor de

metaloproteasas) y vanadato 1mM (inhibidor de fosfatasas). La muestra se guardó a -20°C hasta el momento de su uso.

Western blot

La muestra se preparó con buffer de muestra en relación 3:1, se colocó durante dos minutos en un baño a 100°C y se mantuvo en frío hasta el momento de la siembra.

Las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida 7% con SDS que se sometió a una electroforesis utilizando buffer de corrida pH 8,3 con un voltaje constante de 100 volts.

Transferencia

El gel de poliacrilamida y una membrana de nitrocelulosa se equilibraron durante 15 minutos en el buffer de transferencia. Luego se realizó la transferencia de proteínas a la nitrocelulosa (Trans-blot, semi-dry transfer cell, Bio-Rad, USA) durante 30 minutos a 15 volts.

Inmunoblot

La presencia de proteínas fosforiladas en residuos tirosina se determinó por medio de un equipo comercial, ECL Western blotting detection (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra). Para esto se siguieron las recomendaciones del equipo. Brevemente, se incubó la membrana con TBS-T con 1% de bloqueante (albúmina) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados consecutivos con TBS-T durante 3 min en agitación. La membrana se incubó nuevamente durante 1 hora en agitación en TBS-T y

albúmina 1% con el anticuerpo anti-fosfotirosinas (PY20, Amersham pharmacia biotech, Inglaterra) diluido 1:1000. Por ultimo se realizaron varios lavados sucesivos con TBS-T (2 lavados de 2 min, uno de 15 min, 2 de 5 min).

Revelado

Se incubó la membrana con los reactivos del equipo durante 1 minuto. Luego se quitó el exceso de reactivo y se expuso la membrana a diferentes tiempos en una cámara luminométrica para ECL (ECL Mini-camera, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).

Actividad del receptor del TGF β

Se obtuvo el PRP a partir de sangre anticoagulada en ACD-C, como se describió anteriormente. El PRP fue diluido en un volumen igual de PBS-BSA 0.5%-citrato 0.6% con la adición de inhibidores (teofilina 2 Mm e indometacina 1 μ l/ml). Luego la muestra se lavó por centrifugación 2 veces en el mismo buffer y se resuspendió. Las plaquetas fueron ajustadas a 1×10^6 plaq/ μ l y se incubó durante 5 o 60 min. a 37°C en presencia o ausencia de TGF β (100 ng). Finalmente la muestra fue lisada en buffer de lisis, centrifugada a 14000g durante 10 min. y guardada a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteínas por muestra es de 4 μ g/ μ l determinada por el método de Lowry. Para determinar la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina se siguió el mismo protocolo de western blot, transferencia e inmunoblot utilizados para determinar la presencia de estas proteínas en las palquetas lavadas por metrizamide.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como mediana y rango. Para la comparación realizada entre el grupo de pacientes y el control se utilizó el test de suma de rangos de Mann-Withney Wilcoxon, mientras que para la comparación entre el mismo grupo de pacientes, antes del tratamiento y durante la remisión hematológica se utilizó el test suma de rangos para muestras apareadas. En el caso del bFGF plasmático, donde algunos valores estuvieron por debajo del límite de detección, los datos se categorizaron para su análisis; la primera categoría incluyó los valores no detectables. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Soluciones

Anticoagulante

ACD-C

citrato de Na	12.4mM
ácido cítrico	13 mM
glucosa	11 mM

Lavado de plaquetas

Solución Hanks

KCl	2.7 mM
NaCl	137 mM

Na ₂ CO ₃	12 mM
NaPO ₄ H ₂	0.36 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucosa	55 mM
pH 7.4	

Buffer Fosfato

ClNa	0.145M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	15.9mM
Na ₂ HPO ₄	8.6mM
glucosa	11.1mM

Western blot e Immunoblot

Buffer Muestra

Tris-HCL pH 6,8	62.5mM
Glicerol	2%
SDS	2%
β-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0.05%

Buffer de corrida

Tris base	24.8mM
glicina	0.19M
SDS	0.1%

Buffer de transferencia (Towbin) pH 8,3

Tris	25mM
Glicina	192mM
Etanol	20%

TBS-T

Tris pH 7,5	10mM
ClNa	0.1M
Tween 20	0.1%

Electroforesis para geles de agarosa

TAE

Tris-acetato	0.04 M
EDTA	0.001 M

Actividad del receptor de TGF β

Buffer de lisis

Tris	20 mM	pH 7.5
NP40	1%	
ClNa	137 mM	
Glicerol	10%	
FlNa	50 mM	
ClMg	5 mM	
EDTA	1 mM	
VaNa	1 mM	
PMSF	1 mM	

Aprotinina 2µg/ml

Leupeptina 2µg/ml

SDS 10%

RESULTADOS

4.1 Niveles del PDGF

Niveles Plasmáticos

Se estudió el nivel plasmático del PDGF en el plasma pobre en plaquetas de 33 pacientes con trombocitemia esencial. Se encontró un aumento significativo del nivel de esta citoquina con respecto al grupo control, 3702.5 (630-10310) pg/ml (mediana y rango) y 2115 (614-5370) pg/ml, respectivamente $p=0.00001$. Diez de los 33 pacientes tuvieron valores superiores al rango normal (Figura 1A). Dieciocho de estos pacientes fueron estudiados durante la remisión clínica y hematológica por el tratamiento con anagrelide. En ellos el nivel de esta citoquina alcanzó el rango normal (pacientes en tratamiento vs control, $p=0.86$). El valor encontrado en este grupo de pacientes previamente al tratamiento fue de: 3228.5 (630-10310) pg/ml y en los pacientes durante el tratamiento: 1920 (674-6970) pg/ml (Fig 1B) y ambos grupos difieren significativamente entre si, $p=0.019$.

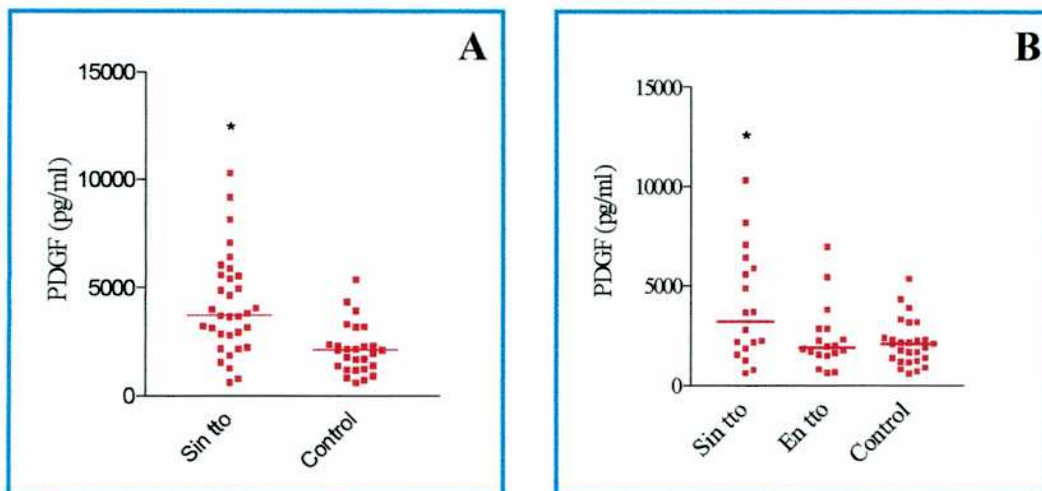


Figura 1 : Niveles plasmáticos de PDGF en pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes. B) Dieciocho pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales. *, pacientes sin tratamiento vs control, $P=0.00001$.

En el exámen de la biopsia medular, once de los pacientes presentaron fibrosis reticulínica leve. Este grupo de pacientes difiere significativamente en sus valores de PDGF plasmático con respecto al grupo de pacientes que no presenta fibrosis medular. Los valores fueron: 4641 (1869-103100) pg/ml y 3439 (630-8164) pg/ml respectivamente, $p=0.04$.

Niveles Intraplaquetarios

En 26 pacientes se estudió el nivel intraplaquetario del PDGF. Los niveles de esta citoquina en las plaquetas se encontraron disminuidos significativamente con respecto al grupo control, 107 (2-374) ng/ml y 166 (70-303) ng/ml,

respectivamente, $p=0.0001$. Nueve de los 26 pacientes estudiados tuvieron los valores de la citoquina por debajo del rango normal (figura 2A). Catorce de estos pacientes fueron estudiados durante la remisión hematológica de la enfermedad y solo uno de ellos mostró valores inferiores al rango normal. Los valores encontrados en ambos grupos de pacientes fueron: 107 (2-374) ng/ml previo al tratamiento y 148 (21-338) ng/ml durante el mismo. La diferencia entre ambos grupos no fue significativa, $p=0.38$, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los pacientes en tratamiento y el grupo control ($p=0.19$). Los resultados se muestran en la figura 2B.

No se hallaron diferencias significativas en los valores intraplaquetarios de la citoquina comparando los pacientes que tenían fibrosis reticulínica leve y los que no la tenían.

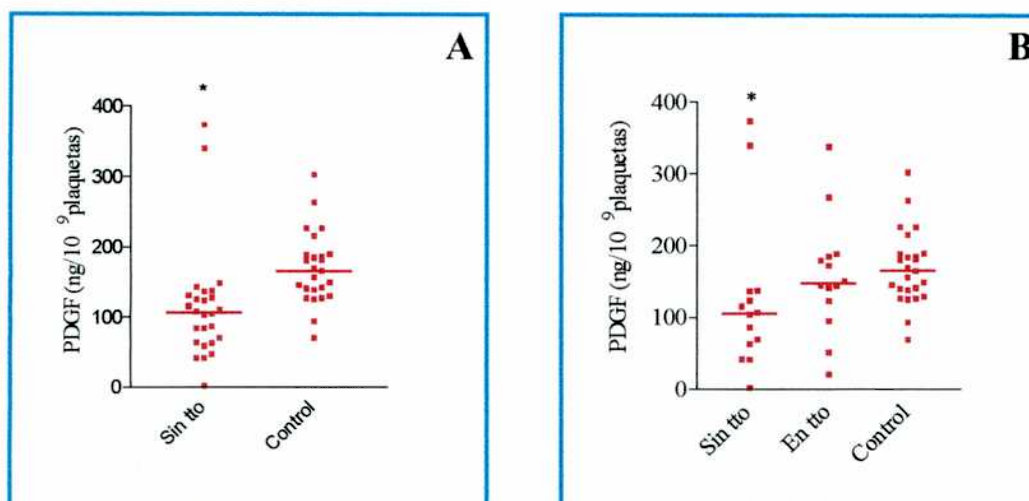


Figura 2 : Niveles intraplaquetarios de PDGF en pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes. B) Se representan 14 pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales. *, pacientes sin tratamiento vs control: $p=0.0001$.

Las plaquetas en los pacientes con trombocitemia esencial liberarian parte de la proteína al plasma por encontrarse en un estado preactivado debido al alto número de ellas en sangre periférica (Cortelazzo, 1981; Gersuk, 1989). Si se calcula la cantidad de proteína liberada por cada plaqueta relacionando el nivel plasmático de la citoquina y el número de plaquetas en cada paciente y se compara con el grupo control, se puede ver que la cantidad de proteína liberada por plaqueta está significativamente disminuida en los pacientes sin tratamiento ($p=0.0008$). Por lo tanto cada plaqueta en los pacientes con trombocitemia esencial libera menos citoquina que las plaquetas en condiciones normales. Esta liberación por plaqueta se normaliza en los pacientes tratados.

Niveles de expresión

Para estudiar la posibilidad de una desregulación en la síntesis de esta citoquina se evaluó el nivel del ARN mensajero en las plaquetas de los pacientes, para poder estimar así indirectamente, el nivel de expresión que posee el megacariocito (lugar donde se sintetiza la citoquina).

Por la técnica de RT-PCR semicuantitativa se midió el nivel del ARN mensajero del PDGF en las plaquetas de 9 pacientes con trombocitemia esencial antes y durante el tratamiento con anagrelide y un grupo similar de controles normales. La figura 3 muestra un ejemplo de un paciente sin tratamiento, un control normal y un paciente tratado.

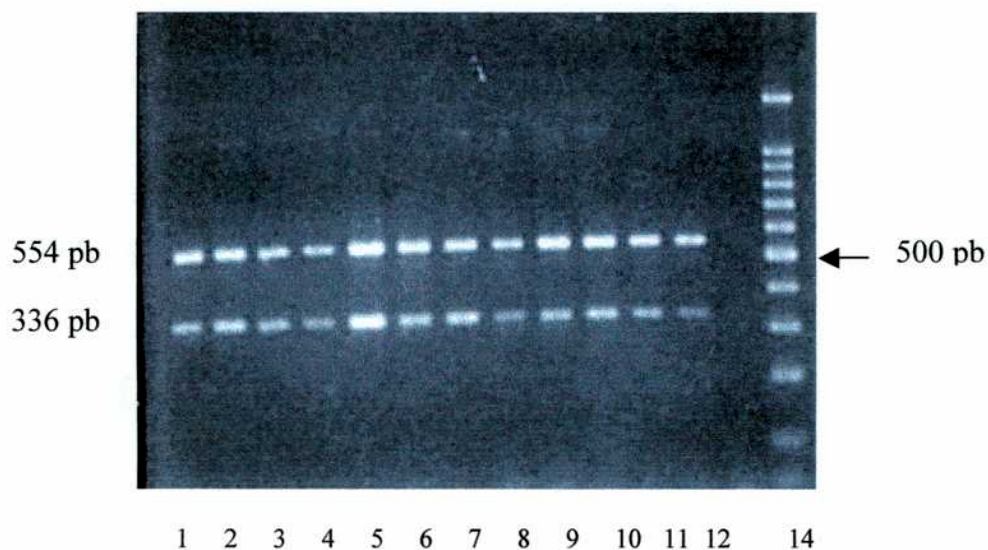


Figura 3: Amplificación del ARN mensajero del PDGF. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de una muestra de un paciente sin tratamiento (calles 1-4), un control normal (calles 5-8) y un paciente tratado (calles 9-12). En la calle 13 se observa el control negativo de amplificación de la PCR y en la calle 14 el marcador de pesos moleculares (marcador 100pb). Las muestras fueron amplificadas en diluciones seriadas. La banda superior corresponde a la amplificación del control interno la enzima GAPDH (554 pb) y la inferior a la amplificación del PDGF (336 pb).

El nivel del ARN mensajero del PDGF se calculó obteniendo la relación entre la densidad de la banda de amplificación de este y la del control interno. Observamos que el ARN mensajero se encuentra disminuido en las plaquetas de los pacientes sin tratamiento comparado con el grupo control, relación PDGF/ GAPDH: 0.28 (0.25-0.44) y 0.59 (0.35-2.15), respectivamente, $p=0.013$. Cuando el recuento plaquetario se normaliza, el nivel del ARN permanece disminuido con respecto al control (relación PDGF/ GAPDH: 0.37 (0.12-0.55), $p=0.009$, aunque se puede ver que la mediana de este grupo se eleva levemente con respecto al

valor inicial. Los resultados se muestran en la figura 4, en la que se representa la relación obtenida entre la densidad de la banda de amplificación del PDGF y la del control (la GAPDH).

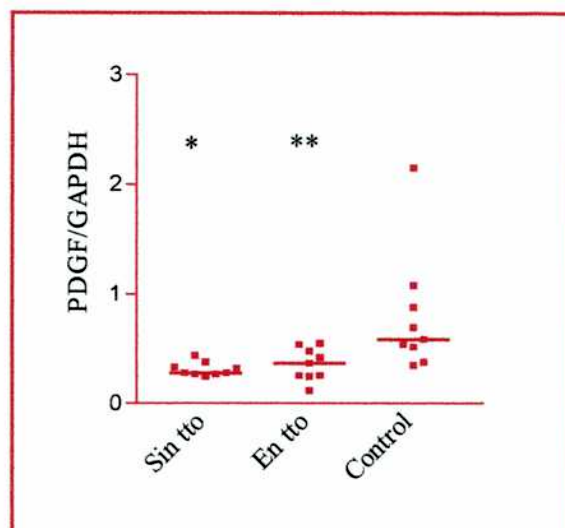


Figura 4: Niveles intraplaquetarios de ARN mensajero de PDGF. Se representan: pacientes sin tratamiento, tratados y controles normales. Los valores representan la relación obtenida entre la densidad de la banda de amplificación del ARN mensajero del PDGF y la del control interno. Las barras horizontales representan las medianas de los grupos. *, $p=0.013$ y **, $p=0.009$ comparados con el grupo control.

Si se considera que existe una relación directa entre el nivel del ARN plaquetario y la cantidad de la proteína sintetizada en el megacariocito, se puede suponer que la síntesis de la proteína se encuentra disminuida en estas células. Por lo tanto, ésta sería una explicación posible para la disminución de la proteína encontrada en las plaquetas.

Como ya se mencionó, durante el tratamiento, el nivel del ARN mensajero intraplaquetario tiende a normalizarse (figura 4), al igual que la proteína intraplaquetaria, la plasmática y la liberación por plaqueta.

4.2 Niveles de $TGF\beta_1$

Niveles Plasmáticos

Se estudió el nivel plasmático de $TGF\beta_1$ en 34 pacientes con trombocitemia esencial. Los valores de esta citoquina se encontraron significativamente elevados con respecto al grupo control, 1644 (852-2805) pg/ml y 611 (107-1286) pg/ml, $p<0.00001$, respectivamente. Solo 7 de los 34 pacientes tuvieron valores dentro del rango normal (figura 5A).

Dieciocho de estos pacientes fueron estudiados durante la remisión hematológica por el tratamiento con anagrelide, los niveles de la citoquina no se modificaron con la normalización del recuento plaquetario. Los valores encontrados en este grupo de pacientes previo al tratamiento fueron: 1392 (852-1851) pg/ml y 1361 (618-2346) pg/ml durante el mismo. Por lo tanto, el nivel plasmático de la citoquina se mantuvo elevado comparado con el grupo control, $p<0.00001$ y no difiere significativamente de los pacientes sin tratamiento ($p=0.96$) (figura 5B).

No se encontró diferencia significativa en los niveles plasmáticos de TGF β entre los pacientes que poseen o no fibrosis reticulínica leve, tanto en los pacientes sin tratamiento como en los tratados.

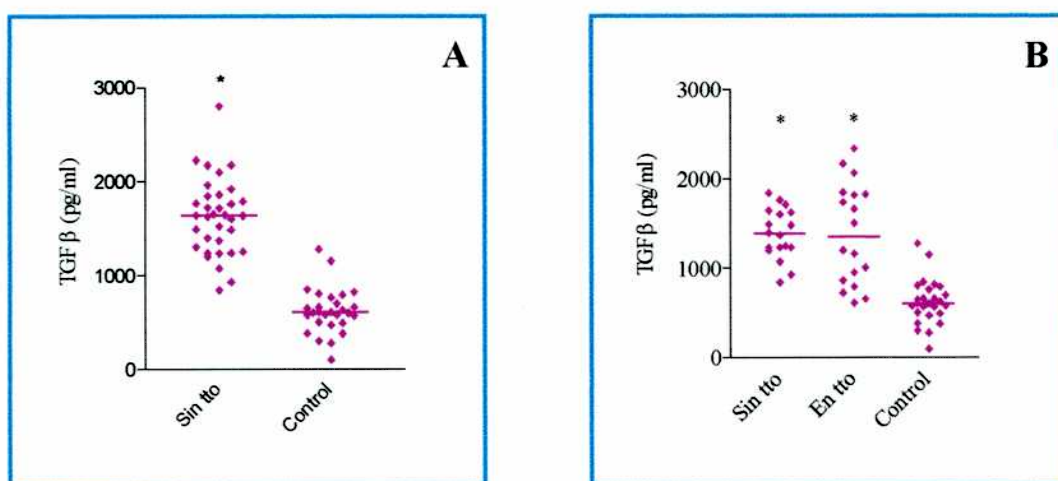


Figura 5 : Niveles plasmáticos de TGF β en pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes. B) Dieciocho pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales. *, pacientes vs control $p < 0.00001$.

Niveles Intraplaquetarios

Se estudiaron los niveles de TGF β intraplaquetarios en 28 pacientes con trombocitemia esencial. Los valores de TGF β_1 encontrados fueron: 171 (46-422.5) ng/ml que no difirieron significativamente del grupo control, 161 (80-377) ng/ml, $p = 0.66$ (figura 6A).

Dieciseis pacientes fueron estudiados durante la remisión hematológica de la enfermedad, con el recuento plaquetario normal. Los valores encontrados fueron similares al grupo control; 233 (83-442) ng/ml y 180 (124-267) ng/ml en pacientes sin tratamiento y tratados respectivamente, $p=0.49$ (pacientes tratados vs control)(figura 6B).

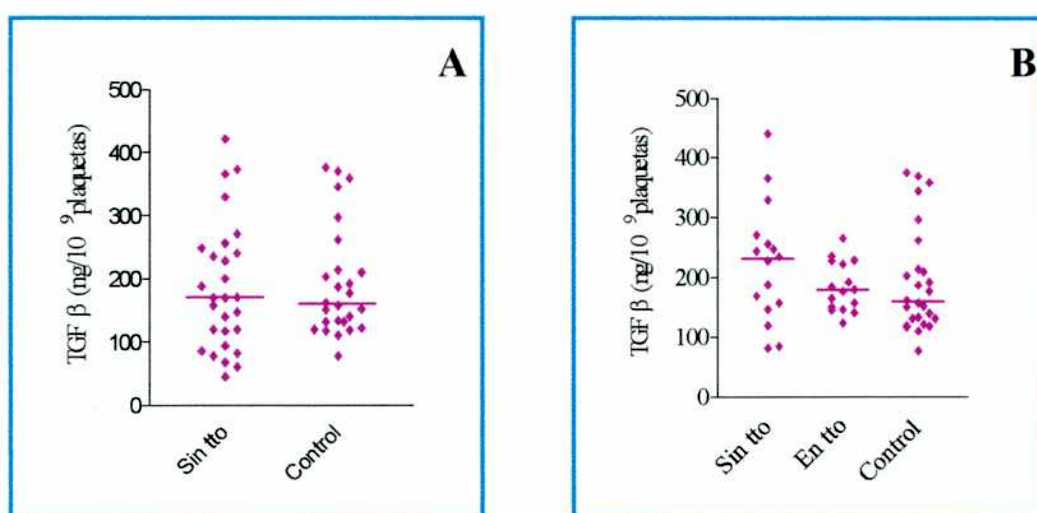


Figura 6: Niveles intraplaquetarios de TGFβ de pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes. B) Pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales.

Niveles de expresión

A pesar de que el TGFβ se encontró normal en las plaquetas de los pacientes con trombocitemia esencial está elevado en el plasma de estos pacientes,

por lo tanto, su síntesis en los megacariocitos podría estar incrementada y por liberación plaquetaria, ser detectado en forma normal dentro de las plaquetas. Por esto se estudió el nivel del ARN mensajero de la citoquina en las plaquetas de los pacientes asumiendo que reflejan el estado de síntesis del megacariocito.

El nivel del ARN mensajero para esta citoquina se estudió en 9 pacientes con trombocitemia esencial sin tratamiento y durante el tratamiento con anagrelide y en un grupo similar de controles normales por RT-PCR semicuantitativa.

En la figura 7 se muestra un ejemplo representativo de la amplificación del ARN mensajero para $TGF\beta$ de un paciente sin tratamiento, un control y un paciente tratado.

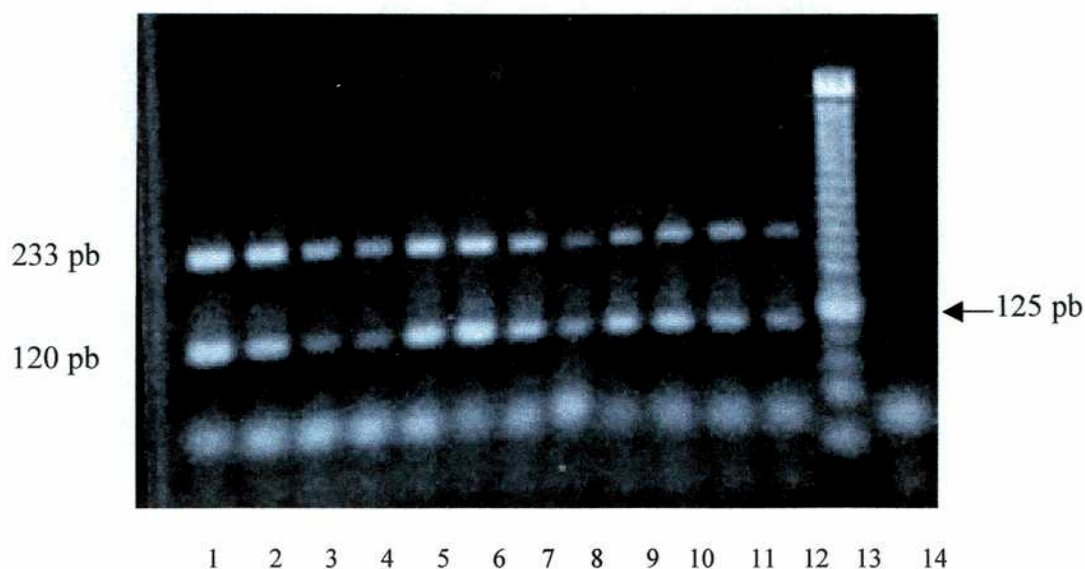


Figura 7: Amplificación del ARN mensajero del TGF β . Se muestra el resultado de la amplificación por PCR en un gel de agarosa de una muestra de un paciente sin tratamiento (calles 1-4), un control normal (calles 5-8) y un paciente tratado (calles 9-12). En la calle 13 se observa el marcador de pesos moleculares (marcador 25 pb) y en la calle 14 el control negativo de amplificación de la PCR. Las muestras fueron amplificadas en diluciones seriadas. La banda superior corresponde a la amplificación del TGF β (233 pb) y la inferior a la amplificación del control interno la β_2 microglobulina (120 pb).

El nivel del ARN mensajero de TGF β se calculó obteniendo la relación entre la densidad de la banda de amplificación de éste y la del control interno. Se encontró un aumento del ARN mensajero del TGF β en los pacientes sin tratamiento. La relación TGF β / β_2 microglobulina obtenida en el grupo de pacientes fue: 0.74 (0.62-1.31) y 0.37 (0.29-0.67) en el grupo control, $p= 0.009$. Durante la normalización del recuento plaquetario por el tratamiento con anagrelide, el nivel del ARN mensajero disminuye y no se diferencia significativamente del grupo control. La relación TGF β / β_2 microglobulina

obtenida fue: 0.61 (0.30-1.64), $p=0.097$, si bien se observa que la mediana del grupo permanece levemente elevada con respecto a éste.

Los resultados se muestran en la figura 8. Se representa la relación obtenida entre la densidad de la banda de amplificación del ARNm del TGF β y del mensajero control (β_2 microglobulina).

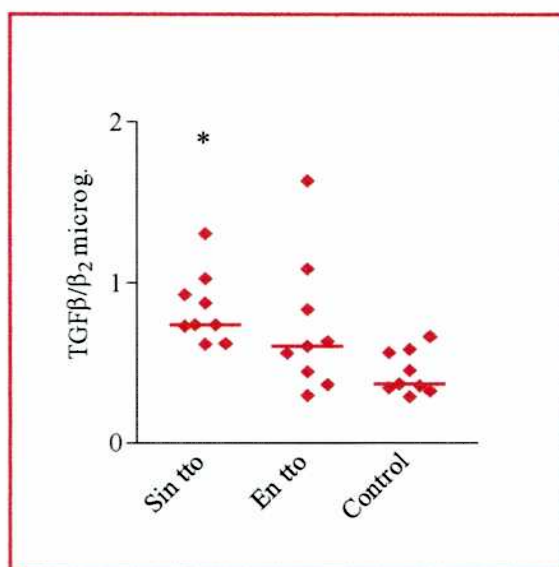


Figura 8: Niveles de ARN mensajero intraplaquetario de TGF β en pacientes con trombocitemia esencial. Se representan: pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. Los valores representan la relación obtenida entre la densidad de la banda de amplificación del ARN mensajero del TGF β y la del control interno. La línea horizontal representa la mediana de la muestra. *, pacientes sin tratamiento vs control: $p<0.009$.

El aumento del ARN mensajero para la citoquina en los pacientes sugeriría un aumento de la síntesis de la proteína en el megacariocito y se esperaría que se

encuentre por lo tanto, un aumento de la misma en las plaquetas (si bien no se puede descartar la existencia de una desregulación a nivel de la síntesis). La diferencia entre el nivel del ARN mensajero aumentado y la proteína intraplaquetaria normal podría explicarse si parte de la proteína es liberada por las plaquetas. Sin embargo, dado que el valor de la citoquina en el plasma no se corrige cuando se normaliza el número de plaquetas, su contribución al incremento plasmático observado en los pacientes no parece ser significativo. Por lo tanto, debe haber otra fuente celular que sintetice esta proteína en forma incrementada.

Detección intracelular de $TGF\beta_1$ en linfocitos y megacariocitos:

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas no parecen ser la causa principal del incremento del $TGF\beta$ plasmático en los pacientes con trombocitemia esencial, ya que el nivel plasmático de la citoquina continúa aumentado en los pacientes con recuento plaquetario normalizado por el tratamiento con anagrelide. Por lo tanto, se quiso determinar cual sería una posible fuente celular causante de este incremento.

Para esto, se estudió por inmunofluorescencia, la presencia de la citoquina en linfocitos T y en megacariocitos de sangre periférica en un grupo de ocho pacientes en tratamiento y en un grupo similar de controles normales, utilizando

una marcación simultanea para identificar el tipo celular al mismo tiempo que el TGF β .

Los resultados mostraron que el TGF β se expresa tanto en linfocitos como en megacariocitos, con un patrón de intensidad de fluorescencia similar en los pacientes y en los controles. La figura 9 muestra la marcación del TGF β en ambos tipos celulares en un paciente con trombocitemia esencial.

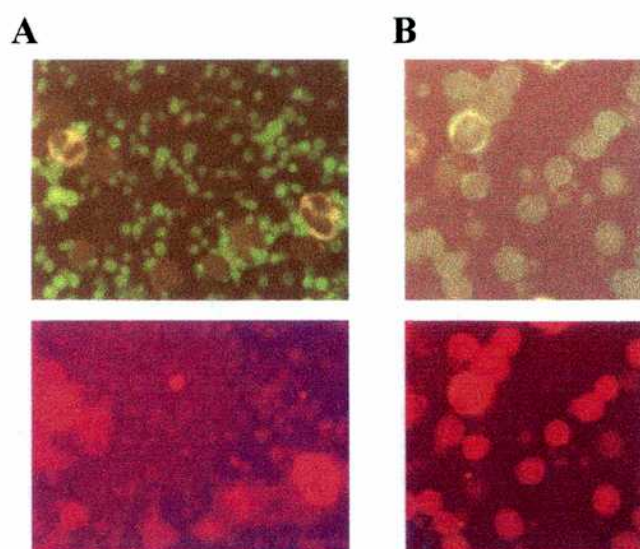


Figura 9: Inmunofluorescencia de células mononucleares de sangre periférica. Marcación conjunta de A) megacariocitos marcados con CD61 conjugado a FITC, anticuerpo que reconoce la glicoproteína IIIa (verde) (panel superior) y el anticuerpo anti TGF β (rojo) (panel inferior); B) linfocitos marcados con CD3 conjugado a FITC (verde) (panel superior) y el anticuerpo anti-TGF β (rojo) (panel inferior). Magnificación original: 400x. Los controles negativos se realizaron reemplazando los anticuerpos por inmunoglobulinas no inmunes y no se observó marcación positiva.

Dado que la intensidad de inmunofluorescencia observada fue similar tanto en los pacientes como en los controles, podemos pensar que los linfocitos no estarían contribuyendo en el incremento observado del nivel de esta citoquina en el plasma. Los megacariocitos, por otro lado, podrían ser una fuente causante de este incremento; si bien no producirían la citoquina en forma incrementada, el número de estas células en los pacientes con trombocitemia esencial se encuentra aumentado y esto podría generar una mayor liberación de la citoquina.

4.3 Niveles de bFGF

Niveles Plasmáticos

El nivel plasmático de bFGF se midió en 33 pacientes con trombocitemia esencial.

Los valores en el grupo control se encontraron por debajo del límite de detección del ELISA ($< 1\text{pg/ml}$), sólo cuatro de los 29 normales estudiados tuvieron valores dosables, por lo que los datos fueron categorizados para la realización del análisis estadístico.

Se encontró un aumento significativo del nivel de esta citoquina en los pacientes sin tratamiento con respecto al grupo control, $4.4 (<1-16) \text{pg/ml}$, $p<0.00001$ (figura 10A). El valor de bFGF fue dosable en 26 de los 33 pacientes estudiados. Dieciocho de estos pacientes fueron estudiados nuevamente cuando tenían recuentos de plaquetas normales, durante la remisión hematológica por el

tratamiento con anagrelide. Los niveles del bFGF disminuyeron con respecto a los pacientes sin tratamiento ($p<0.0016$). En los dieciocho pacientes sin tratamiento los valores fueron: 3.75 (<1-15.94) pg/ml, 17 de ellos tuvieron valores dosables. En los pacientes tratados los valores fueron: 0.91 (<1-4.4) pg/ml y 7 de los 18 pacientes estudiados tuvieron valores dosables. Sin embargo estos valores se encuentran aún elevados con respecto al grupo control, $p<0.025$ (figura 10B).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de esta citoquina entre los pacientes que poseen o no fibrosis reticulínica leve.

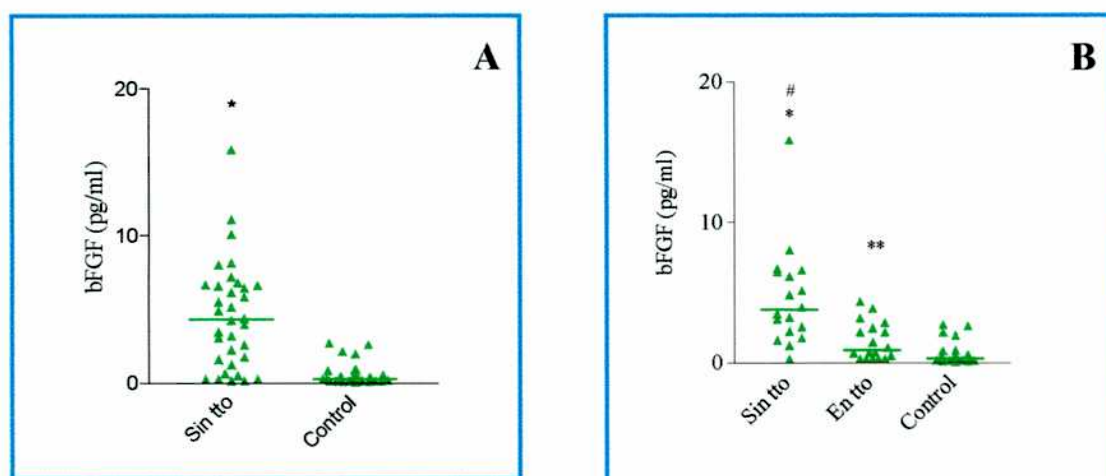


Figura 10: Niveles plasmáticos de bFGF en pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes no tratados B) Dieciocho pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales. *, pacientes sin tratamiento vs control, $p<0.00001$; **, pacientes en tratamiento vs control, $p<0.025$; #, pacientes sin tratamiento vs pacientes tratados, $p<0.0016$.

Niveles Intraplaquetarios

Se estudiaron los niveles del bFGF en las plaquetas de 28 pacientes con trombocitemia esencial. Los valores de la citoquina se encontraron significativamente elevados con respecto al grupo control, 1037.7 (69.5-2424) pg/ml y 211.6 (56-926) pg/ml, respectivamente, $p < 0.00001$ (figura 11A). Quince de los 28 pacientes estudiados tuvieron valores mayores al rango de los controles normales. Dieciseis de los 28 pacientes sin tratamiento fueron estudiados durante la remisión hematológica de la enfermedad. El nivel intraplaquetario en estos pacientes disminuyó con respecto a los pacientes sin tratamiento, $P = 0.0059$. Los valores encontrados en estos grupos fueron: 1130 (502-2424) pg/ml en los pacientes sin tratamiento y 844 (372-1645) pg/ml en los tratados. A pesar que el nivel intraplaquetario disminuye en los pacientes tratados se mantiene significativamente elevado con respecto al control, $p < 0.00001$. Ocho de los 16 pacientes permanecen con valores superiores al rango normal (figura 11B).

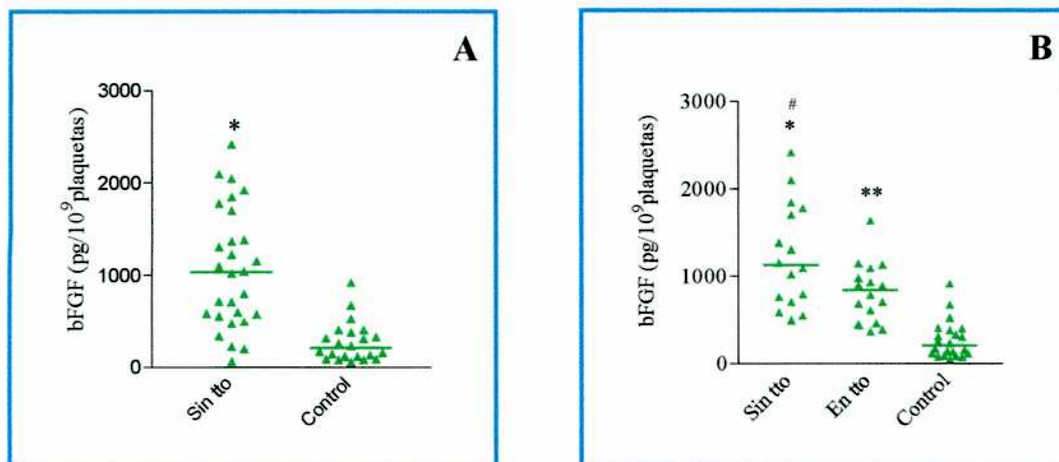


Figura 11: Niveles intraplaquetarios de bFGF en pacientes con trombocitemia esencial. A) Grupo total de pacientes no tratados. B) Dieciséis pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. La mediana se representa por líneas horizontales. *, pacientes sin tratamiento vs control $p < 0.00001$; ** pacientes en tratamiento vs control $p < 0.00001$; # pacientes sin tratamiento vs tratados, $P = 0.0059$.

Niveles de expresión

Para evaluar si existe una desregulación de la síntesis de la citoquina en el megacariocito, se estudió el nivel del ARN mensajero del bFGF en 9 pacientes con trombocitemia esencial antes del tratamiento con anagrelide y durante la remisión hematológica por RT-PCR semicuantitativa.

En la figura 12 se muestra un ejemplo representativo de la amplificación del ARN mensajero para bFGF de un paciente sin tratamiento, un control y un paciente tratado.

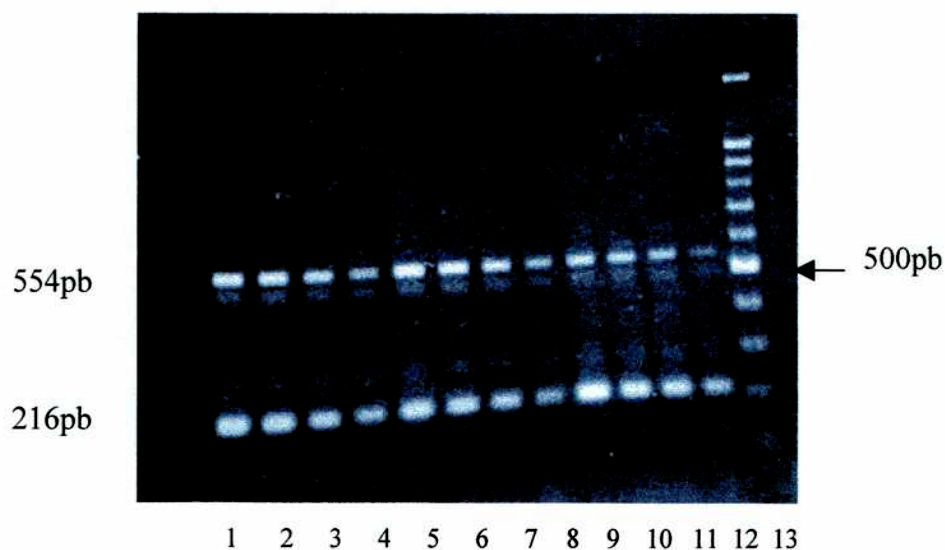


Figura 12: Amplificación del ARN mensajero del bFGF. Se muestra un ejemplo de una muestra de un paciente sin tratamiento (calles 1-4), un control normal (calles 5-8) y un paciente tratado (calles 9-12). En la calle 13 se observa el marcador de pesos moleculares (100pb). Las muestras fueron amplificadas en diluciones seriadas. La banda superior corresponde a la amplificación del control interno, GAPDH (554 pb) y la inferior a la amplificación del bFGF (216 pb).

El nivel del ARN mensajero de bFGF se calculó obteniendo la relación entre la densidad de la banda de amplificación del mismo y la del control interno. El nivel de ARN mensajero de esta citoquina se encontró normal tanto en los pacientes sin tratamiento como en los tratados. La relación bFGF/GAPDH obtenida fue: 0.81 (0.50-1.78) en los pacientes sin tratamiento, 1.43 (0.60-2.53) en los tratados y 0.75 (0.36-2.10) en el grupo control. Los valores no difirieron

significativamente del grupo control, $p=0.81$ y $p=0.15$, respectivamente (pacientes sin tratamiento y tratados con respecto al grupo control).

Los resultados se muestran en la figura 13, donde se representa la relación entre la densidad de la banda de amplificación del bFGF y de la GAPDH.

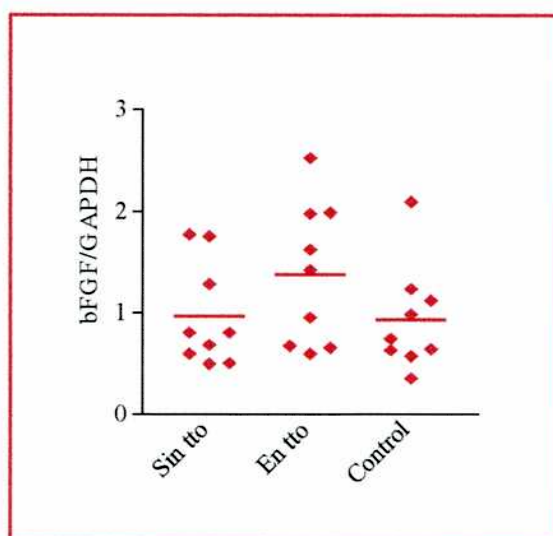


Figura 13: Niveles de ARN mensajero de bFGF intraplaquetario en pacientes con trombocitemia esencial. Se representan: pacientes sin tratamiento, en tratamiento y controles normales. Los valores representan la relación entre la densidad de la banda de amplificación del ARN mensajero del bFGF y la del control interno. La línea horizontal representa la mediana de la muestra.

Dado que la proteína se encontró aumentada en las plaquetas y su ARN mensajero normal, podemos pensar en la existencia de una desregulación en la síntesis de esta proteína en el megacariocito.

Detección intracelular de bFGF en linfocitos y megacariocitos:

La liberación del bFGF por las plaquetas explicaría una parte del incremento de esta citoquina observado en el plasma de los pacientes con trombocitemia esencial, ya que al disminuir el recuento plaquetario se observó una reducción parcial del nivel plasmático de la misma. Sin embargo, debe haber otra fuente celular que contribuya con el aumento de esta citoquina en el plasma y justifique la persistencia del incremento en los pacientes con recuento plaquetario normal.

Para determinar cual sería una posible fuente celular causante de este incremento, se estudió por inmunofluorescencia, la presencia de la citoquina en los linfocitos T y megacariocitos de sangre periférica en un grupo de 8 pacientes con trombocitemia esencial y un número similar de controles normales, utilizando una marcación simultanea para la identificación del tipo celular y la citoquina.

Los resultados mostraron que el bFGF se expresa tanto en linfocitos como en megacariocitos y el patrón de intensidad de fluorescencia fue similar en los pacientes y en los controles normales.

La figura 14 muestra la marcación del bFGF en ambos tipos celulares en un paciente con trombocitemia esencial.

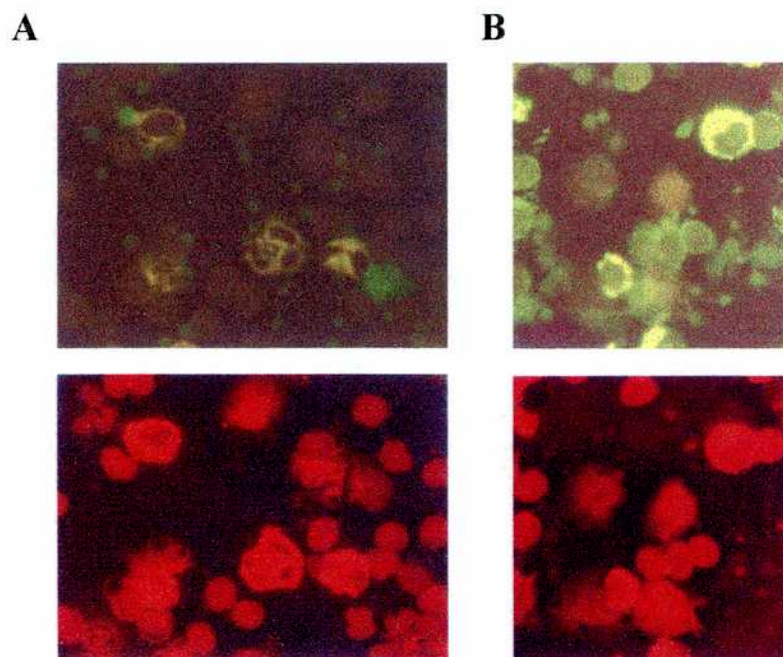


Figura 14: Inmunofluorescencia de células mononucleares de sangre periférica. Marcación conjunta de A) megacariocitos marcados con CD61 conjugado a FITC, anticuerpo que reconoce la glicoproteína IIIa (verde) (panel superior) y el anticuerpo anti-bFGF (rojo) (panel inferior); B) linfocitos marcados con CD3 conjugado a FITC (verde) (panel superior) y un anticuerpo anti-bFGF (rojo) (panel inferior). Magnificación original: 400x. Los controles negativos se realizaron reemplazando los anticuerpos por inmunoglobulinas no inmunes y no se observó marcación positiva.

Dado que la intensidad de fluorescencia observada fue similar en los pacientes y en los controles, los linfocitos no estarían causando el incremento de bFGF observado en los pacientes con trombocitemia esencial. En cambio, los megacariocitos sí podrían ser una fuente responsable de la presencia del incremento de la citoquina en el plasma ya que como mencionamos anteriormente, el número de estas células se encuentra aumentado en los pacientes con TE.

TGFβ y plaquetas normales

Dado que el TGFβ se encontró aumentado en los pacientes con trombocitemia esencial, que este incremento persiste durante la remisión hematológica de la enfermedad y que estos pacientes presentan anomalías en el funcionamiento plaquetario (como fue descrito en la introducción) se estudió el efecto que esta citoquina ejerce *in vitro* sobre las plaquetas y el posible mecanismo de esta acción.

Presencia del receptor en la membrana plaquetaria

Por citometría de flujo se determinó la presencia del receptor para TGFβ en la membrana plaquetaria utilizando como ligando del receptor, la citoquina marcada. Se evaluó la intensidad de fluorescencia media (Gmean). Los resultados se expresan como la relación entre la Gmean obtenida con TGFβ y la obtenida con la proteína inespecífica (STI).

En la figura 15 se muestra un ejemplo de la marcación de la citoquina con respecto a la proteína inespecífica en una muestra de plaquetas.

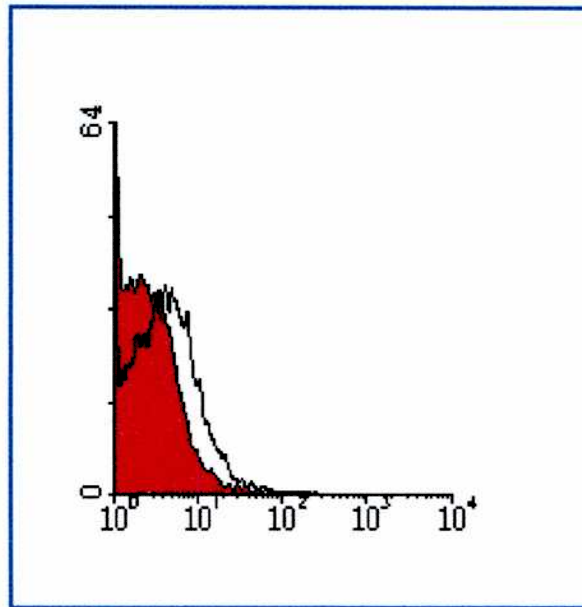


Figura 15: citometría de flujo. Las plaquetas fueron incubadas en presencia de una proteína inespecífica control o de TGF β biotinilado y luego un conjugado avidina-FITC. En rojo se muestra la intensidad de fluorescencia obtenida con la proteína inespecífica y en la línea sin color, la intensidad de fluorescencia producida por el TGF β .

Se observó una marcación con TGF β que difiere significativamente de la marcación obtenida con la proteína inespecífica ($p=0.0005$), la relación entre la Gmean del TGF β y la Gmean de la proteína inespecífica fue: 1.2 (1.12-1.7) (mediana y rango). Los resultados se muestran en la figura 16.

Dado que se encontró aumentada la concentración plasmática del TGF β en los pacientes con trombocitemia esencial se estudió si esta citoquina tenía algún efecto sobre la función plaquetaria. Esto se evaluó por estudios de agregación en controles normales.

Como se mencionó en la introducción, para evaluar la función plaquetaria se utilizan diferentes agonistas, entre ellos el ADP. En los estudios de agregación realizados normalmente el ADP se utiliza en una concentración 2 μ M. Esta concentración produce una agregación primaria y secundaria (agregación total) (figura 17). Con concentraciones de ADP entre 0.8 y 1.6 μ M se obtiene solamente agregación primaria (figura 17). La concentración necesaria para obtener esta respuesta varía con cada control normal y por lo tanto debe ser ajustada en cada experimento.

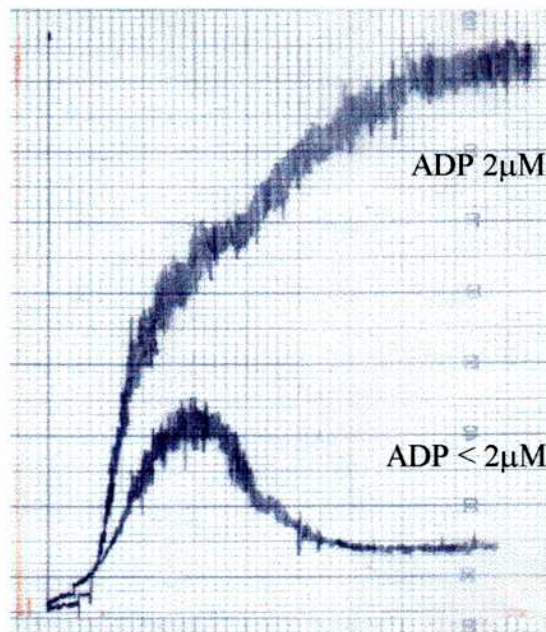


Figura 17: registro de una agregación. La línea registrada representa el aumento del paso de la luz como consecuencia de la agregación plaquetaria.

TGF β como inductor de la agregación

El TGF β se utilizó como agonista de la activación plaquetaria. Para esto se lo incubó con la muestra de plaquetas durante 1 o 60 minutos con 10 o 100 ng/ml de TGF β a 37° C y luego se colocó la muestra en agitación en el agregómetro, sin la adición de ningún agonista. Los resultados mostraron que el TGF β por sí mismo no es capaz de inducir la agregación plaquetaria (figura 18).

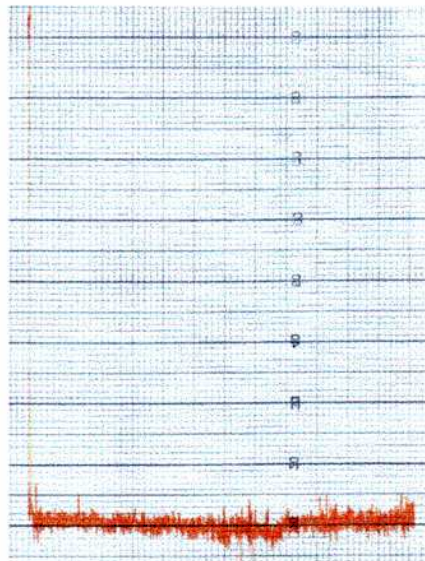


Figura 18: Agregación de plaquetas incubadas durante 60 minutos con $\text{TGF}\beta$ (100ng/ml). En estas condiciones no se observó agregación plaquetaria.

Efecto del $\text{TGF}\beta$ sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP

Dado que el $\text{TGF}\beta$ no induce agregación plaquetaria por si mismo, se utilizó el ADP como inductor de la respuesta. De forma similar a la anterior se incubó la muestra de plaquetas con $\text{TGF}\beta$ (100ng/ml) a 37°C , pero ahora la agregación se indujo con diferentes concentraciones de ADP.

Los resultados obtenidos fueron variables.

- *Concentraciones bajas de ADP:*

Al incubar durante 5 minutos con 100 ng/ml de TGF β , se observó una potenciación de la agregación: en las concentraciones en que el ADP produce solamente agregación primaria se vio una agregación total o un incremento de entre 12 y 20 %. Los resultados se muestran en la figura 19A.

Al incubar durante 60 minutos a 37°C con la misma concentración de TGF β también se observó un incremento de la agregación secundaria. Cabe destacar que las plaquetas al ser incubadas a 37°C durante períodos prolongados disminuyen su funcionalidad, el porcentaje basal de agregación total observado es menor con respecto a la misma muestra sin incubación. El aumento de la agregación obtenido en presencia de TGF β fue de 30 a 50% (figura 19B).

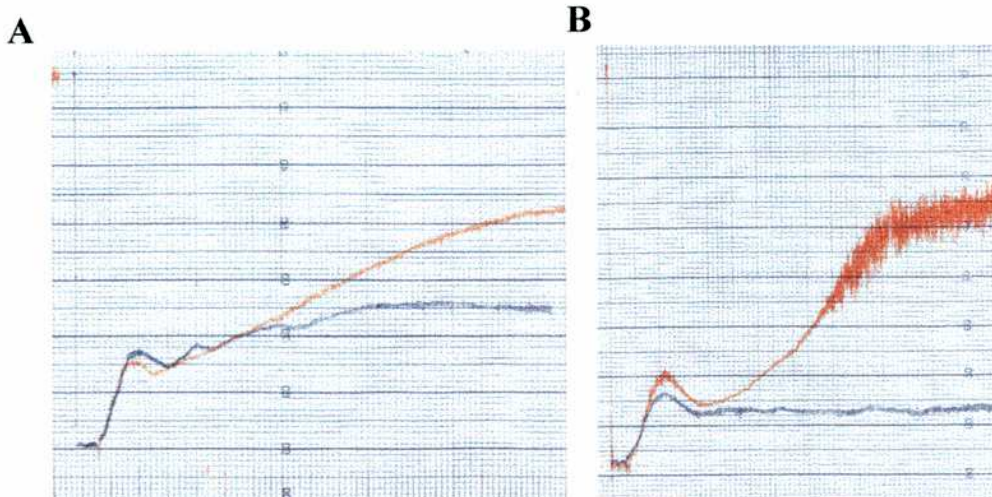


Figura 19: Agregación plaquetaria con concentraciones bajas de ADP. A) Muestra incubada con TGF β durante 5 minutos. B) Muestra incubada con TGF β durante 60 minutos. La línea negra representa el registro de la agregación basal y la línea roja el registro de la agregación producida por la incubación de la muestra con TGF β .

- *Concentraciones altas de ADP:*

Al incubar durante 5 minutos en presencia de $\text{TGF}\beta$ (100 ng/ml) se observó una disminución del 10 al 20% de la agregación (figura 20A).

En cambio, al incubar la muestra durante 60 minutos a 37°C con las mismas concentraciones de $\text{TGF}\beta$ se observó un incremento del 10 al 12% de la agregación secundaria (figura 20B).

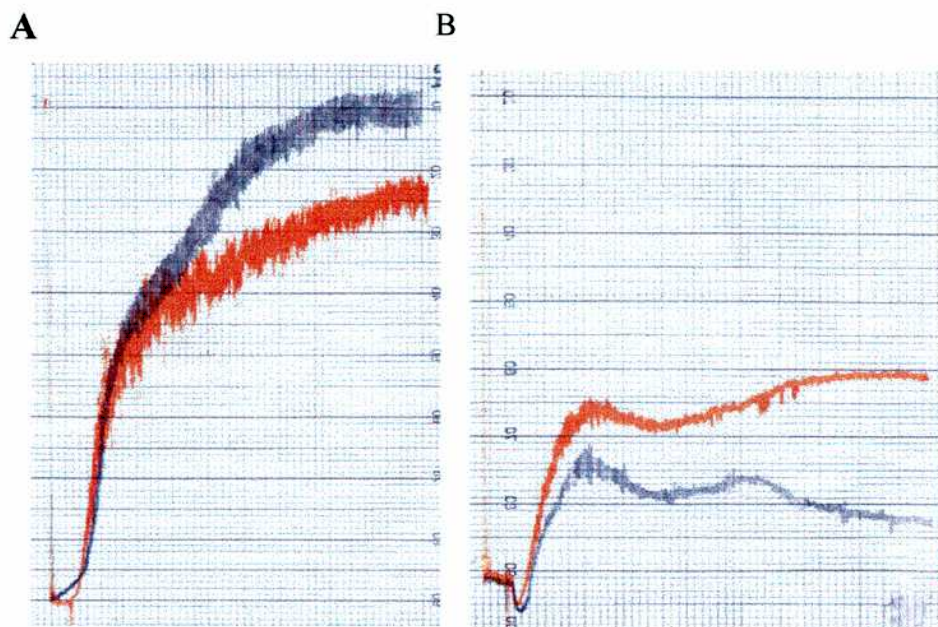


Figura 20: Agregación plaquetaria con concentraciones altas de ADP. A) Muestra incubada con $\text{TGF}\beta$ durante 5 minutos. B) Muestra incubada con $\text{TGF}\beta$ durante 60 minutos. La línea negra representa el registro de la agregación basal y la línea roja el registro de la agregación producida por la incubación de la muestra con $\text{TGF}\beta$.

Fosforilación de Proteínas

Como se mencionó en la introducción, la inducción de una respuesta celular a través del TGF β está mediada por los receptores específicos de tipo I y el de tipo II (53 y 73-95 kd, respectivamente). El receptor de tipo II se encuentra fosforilado, se autofosforila por la unión del ligando y fosforila al receptor de tipo I en residuos serina y/o treonina y ambos poseen actividad de serina/treonina quinasas (Wrana, 1992, 1994; Luo, 1997). Estos receptores pueden activar las vías de las MAPK y/o la de las proteínas Smad, y no se conoce a través de que proteínas participan en el proceso de agregación plaquetaria.

Para determinar si el receptor transduce una señal específica en la plaqueta se incubaron las plaquetas en presencia de inhibidores como teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa cíclica) e indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa) que bloquean las vías de activación plaquetaria. En estas condiciones se incubó la muestra en presencia o ausencia de TGF β . No se observó por western blot la aparición de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en presencia de la citoquina (figura 21). En la figura se observa la proteína de 60 kd, identificada como Src, que se encuentra fosforilada en la plaqueta en reposo.

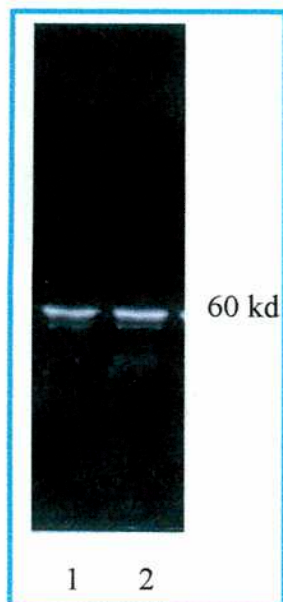


Figura 21: Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inducida por el TGFβ. Las plaquetas inhibidas en su capacidad de agregar fueron incubadas durante 60 min a 37°C en presencia o ausencia de la citoquina, lisadas, sembradas en un gel 7%, transferidas y reveladas por un anticuerpo dirigido contra proteínas fosforiladas en tirosina. Calle 1, muestra incubada con buffer de incubación; calle 2, muestra incubada con TGFβ.

Los resultados concuerdan con el hecho de que el TGFβ por si mismo no es capaz de inducir la agregación plaquetaria, por lo tanto no iniciaría la cascada de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

Por otra parte, se quiso determinar si el efecto observado en la agregación se ve reflejado en la vía de transducción de señales que se genera ante la activación plaquetaria inducida por ADP. Para esto se evaluó nuevamente la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Para estudiar el mecanismo de transducción de señales es necesario separar las plaquetas del plasma para evitar la presencia de proteínas contaminantes, por lo tanto se utilizan plaquetas filtradas por gradiente de

metrizamide. Esta técnica se emplea además, para evitar la activación plaquetaria durante el proceso.

Como se mencionó en la introducción, en el estudio de las proteínas fosforiladas en tirosina en plaquetas se ve un patrón característico para el agonista que depende de su potencia (Bachelot 1992) y de la vía de transducción de señales que este utilice para la activación plaquetaria. No todas las proteínas activadas observadas en este patrón se encuentran caracterizadas. En las plaquetas en reposo, se observan algunas proteínas fosforiladas de las siguientes masas moleculares: 130, 80 (identificada como cortactina; Rosa, 1997), 64, 60 (identificada como proteína quinasa Src; Golden 1986) y 36 kd. Después de la estimulación por diferentes agonistas, algunas proteínas se fosforilan más intensamente y se fosforilan proteínas nuevas (Bachelot 1992).

Utilizando el ADP como agonista (agonista débil) se observó la fosforilación de las siguientes proteínas: 130-125, 105-100, 80, 64 y 60 kd. La intensidad de las bandas varía según el tiempo de agregación.

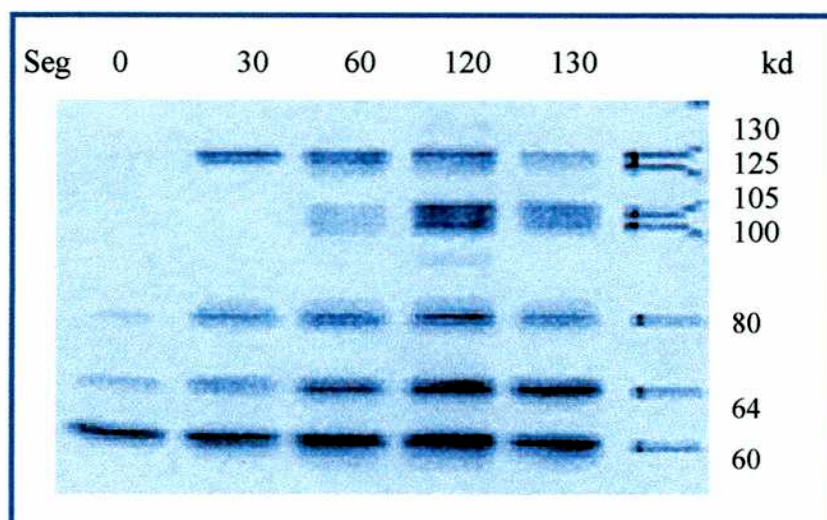


Figura 22: Patrón de las proteínas fosforiladas obtenido por la inducción de la agregación plaquetaria por ADP (Lévy-Toledano, 1998)

Las plaquetas fueron incubadas a 37 °C en presencia o ausencia de la citoquina, para ver si sin inhibir la capacidad de activación plaquetaria el receptor fosforila en forma directa proteínas en residuos de tirosina. No se observaron diferencias con respecto a la muestra incubada con buffer. Las proteínas fosforiladas son producto de la activación plaquetaria basal (figura 23)

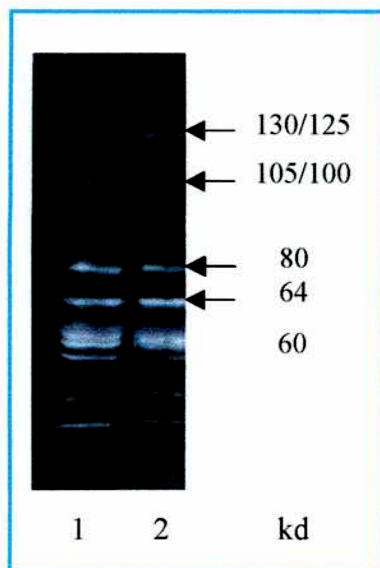


Figura 23: Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Las plaquetas lavadas por gradiente de metrizamide fueron incubadas durante 60 minutos en ausencia (calle 1) o presencia (calle 2) de TGF β .

Cuando se incubaron las plaquetas durante 5 minutos en presencia de TGF β y se estimularon luego con ADP se observó una modificación en el patrón de proteínas fosforiladas comparando con el que se obtiene utilizando solo ADP como agonista. Se observó una disminución en la intensidad de la fosforilación de dos bandas, una de 100 kd y otra de 105 kd (figura 24). Esto no se observó cuando se incubaron las plaquetas durante 60 minutos en presencia de la citoquina.

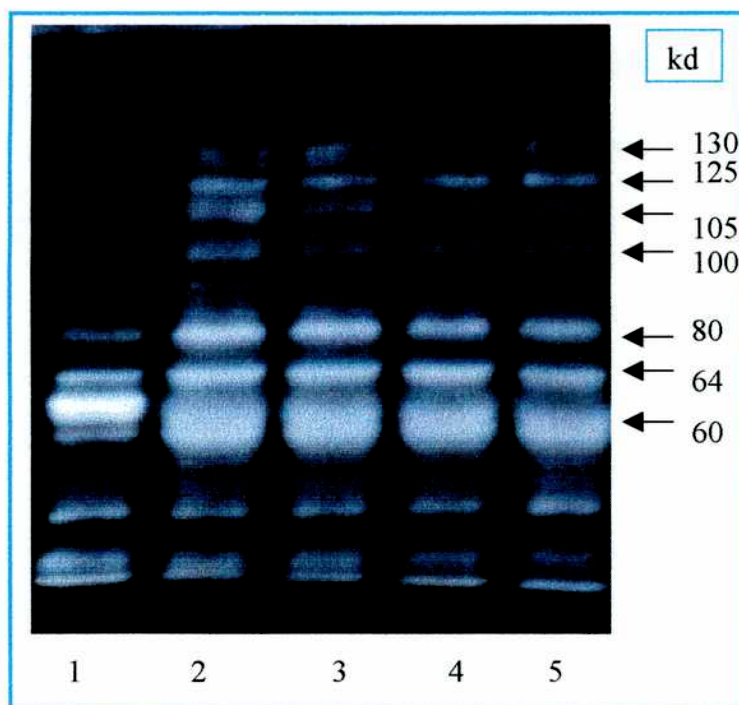


Figura 24: Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Las plaquetas lavadas por gradiente de metrizamide fueron incubadas en ausencia o presencia de TGF β . Calle 1, control; calles 2 y 3, plaquetas incubadas con buffer o TGF β durante 5 min a 37°C; calles 4 y 5, plaquetas incubadas con buffer o TGF β durante 60 min a 37°C.

DISCUSIÓN

5.1 Factores de crecimiento en enfermedades mieloproliferativas

Uno de los criterios de inclusión para el diagnóstico de la trombocitemia esencial (TE) es la ausencia de fibrosis colágena en la biopsia de la médula ósea o que ésta este limitada a 1/3 del área de estudio. La presencia de fibrosis reticulínica leve no es excluyente del diagnóstico. La diferenciación entre la etapa celular de la mielofibrosis y la trombocitemia esencial por histología no resulta sencilla. Los pacientes con trombocitemia esencial pueden evolucionar a mielofibrosis en un 4-15 % según los diversos estudios. Uno de los objetivos de éste estudio fue medir los niveles de factores de crecimiento involucrados en el desarrollo de la mielofibrosis, como el PDGF, el TGF β y el bFGF en pacientes con TE para conocer el rol que desempeñan estas citoquinas en esta enfermedad. Ninguno de los pacientes estudiados presentó fibrosis colágena medular y once de ellos tienen fibrosis reticulínica leve en la médula ósea.

El incremento plasmático observado en el nivel proteico del PDGF-AB en los pacientes con trombocitemia esencial se normaliza con la reducción del recuento plaquetario, por lo tanto, se puede inferir que este incremento es producido por liberación plaquetaria. Esto es apoyado por la descripción realizada previamente por otros autores de que las plaquetas en los pacientes con trombocitemia esencial se encuentran en un “estado preactivado” (Cortelazzo, 1981; Gersuk, 1989). Cuando se evaluó, en el grupo de pacientes estudiados, la cantidad de proteína liberada por cada plaqueta relacionándola con el nivel

plasmático de la citoquina y el número de plaquetas en cada paciente se vió que la cantidad de proteína liberada por plaqueta está disminuida en los pacientes sin tratamiento con respecto al grupo control. Por lo tanto cada plaqueta en los pacientes con trombocitemia esencial libera menos citoquina que las plaquetas en condiciones normales. Esto concuerda con el nivel intraplaquetario disminuido de la citoquina que se observó en las plaquetas de estos pacientes. Sin embargo, el aumento del número de plaquetas en los pacientes produciría el incremento plasmático de la citoquina.

El hallazgo de niveles de PDGF más elevados en los pacientes que poseen fibrosis reticulínica leve en el estudio de la médula ósea, avala el importante rol que se le adjudica a esta citoquina en el proceso de desarrollo de la fibrosis medular en la mielofibrosis con metaplasia mieloide. Castro-Malaspina y col demostraron la existencia de una relación entre el aumento de megacariocitos y la mielofibrosis y postularon que la liberación de citoquinas en el espacio intramedular como consecuencia de la megacariopoyesis inefectiva produciría aumento de la proliferación de fibroblastos y de la síntesis de fibras de colágeno (Castro-Malaspina 1981; 1984b).

Por otro lado, en este estudio se encontró una disminución del nivel intraplaquetario del PDGF que se corrige con la normalización del número de plaquetas por el tratamiento de los pacientes con anagrelide. Estos datos difieren de los reportados en la bibliografía para la MMM, donde el nivel de PDGF intraplaquetario se encontró aumentado (Martyré, 1990) y se postula que esta

citoquina se libera del megacariocito al microambiente medular participando así, en el desarrollo de la fibrosis (Castro-Malaspina, 1981; 1984). Por lo tanto, la diferencia encontrada entre los pacientes con estas enfermedades podría ser una de las posibles explicaciones para la ausencia de fibrosis colágena en los pacientes con trombocitemia esencial.

Para determinar si la disminución del nivel de la citoquina intraplaquetaria se debe a una disminución en su síntesis además de la causada por liberación, se estudió el nivel del ARN mensajero de la cadena A del PDGF. Los resultados mostraron una disminución del ARN mensajero de esta citoquina en las plaquetas de los pacientes sin tratamiento. Por lo tanto, la disminución del contenido intraplaquetario del PDGF podría atribuirse a una disminución de su síntesis en el megacariocito sumado a un aumento de la liberación de la proteína al plasma causado por un “estado preactivado” de las plaquetas en los pacientes con esta enfermedad (Cortelazzo, 1981; Gersuk, 1989). Por el contrario, el grupo de Katoh (1990) por la técnica de hibridización *in situ*, encontró aumentada la expresión de las dos cadenas del PDGF (A y B) en megacariocitos de pacientes con desórdenes mieloproliferativos. La diferencia con respecto a este grupo podría deberse al empleo de técnicas que poseen diferente sensibilidad.

El nivel plasmático del TGF β en los pacientes con trombocitemia esencial se encontró aumentado y el intraplaquetario normal. Los valores intraplaquetarios coinciden con los datos publicados previamente en la bibliografía (Zalui, 1993). El nivel del ARN mensajero para el TGF β se encontró aumentado en las plaquetas

, si la relación entre el ARN y la proteína sintetizada fuera lineal, se esperaría que la proteína estuviese también aumentada en las plaquetas. Sin embargo, la citoquina se encontró normal lo cual podría sugerir que el TGF β se está liberando de las plaquetas al plasma, pero cuando se disminuye el recuento plaquetario por el tratamiento con anagrelide el nivel plasmático de la citoquina no se modifica. Por lo tanto, si bien no se descarta la liberación plaquetaria, ésta no sería la principal causa de su incremento en el plasma y sugiere la participación de otra fuente celular. Si bien los megacariocitos podrían ser las células responsables de este incremento, no se puede descartar la participación de células de otra estirpe. Esta citoquina también fue estudiada en los pacientes con mielofibrosis con metaplasia mieloide, como una proteína de importante participación en el desarrollo de la fibrosis medular, dado los numerosos efectos que posee sobre la síntesis de matriz extracelular y en la quimiotaxis y proliferación de fibroblastos (Jackson, 1973; Roberts, 1986; Ignatz, 1986; Pearson, 1988; Overall, 1989). El TGF β se encontró aumentado en las plaquetas de pacientes con MMM (Martyré, 1991) y también se demostró un aumento del ARN mensajero del TGF β en células mononucleares de sangre periférica. La diferencia entre los niveles proteicos intraplaquetarios de la citoquina en estas dos enfermedades (TE y MMM) podría ser otra de las razones por la cual no se encuentra fibrosis colágena en la médula de los pacientes con TE.

El incremento plasmático de bFGF hallado en este estudio en los pacientes con TE sin tratamiento concuerda con lo publicado previamente en la

bibliografía (Wehmeier, 1997b). Este incremento puede explicarse en parte por liberación plaquetaria, dado que al disminuir el recuento plaquetario, el nivel plasmático de la citoquina también disminuye. Sin embargo, en base a que estos valores permanecen significativamente aumentados con respecto al grupo control luego de normalizarse el recuento plaquetario, se puede suponer que habría otras fuentes celulares participando en su producción. Por inmunofluorescencia se observó que los linfocitos no estarían involucrados, dado que expresan la citoquina con una intensidad similar a la normal y su número no está afectado en los pacientes con trombocitemia esencial. Los megacariocitos, en cambio, podrían ser responsables de parte del incremento plasmático ya que si bien expresan la citoquina con igual intensidad que los controles, su número se encuentra aumentado en los pacientes. Por lo tanto, en este caso la causa del incremento plasmático puede adjudicarse a por lo menos dos fuentes: las plaquetas y los megacariocitos. No se puede descartar la participación de otra línea celular en la liberación de la citoquina en el plasma. El incremento de la citoquina intraplaquetaria podría explicarse por una desregulación de la síntesis en el megacariocito, dado que el ARN mensajero se encontró normal y la proteína aumentada. El bFGF también fue estudiado en la MMM por el grupo de Martyré como otra citoquina de importante participación en el desarrollo de la fibrosis medular debido a que posee propiedades angiogénicas, está involucrada en la proliferación de fibroblastos, reparación de heridas, modulación de células del estroma y megacariocitopoyesis (Folkman, 1987; Gospodarowicz, 1987;

Davidson, 1991; Oliver, 1990; Bruno, 1993). En los pacientes con esta enfermedad se determinó que los megacariocitos son la fuente principal de producción de este factor y se lo encontró aumentado tanto en plaquetas como en megacariocitos (Martyré, 1997). En células CD34+ también se observó un aumento del ARN mensajero del bFGF (Le Bousse-Kerdiles, 1996). Dado que los resultados en pacientes con TE muestran un aumento en la concentración intraplaquetaria de la citoquina, y esto concuerda con los resultados publicados en la MMM, los datos no permiten explicar las diferencias en la fibrosis medular observada entre ambas enfermedades. Esto también está apoyado por el hecho de que los pacientes con TE que tienen fibrosis reticulínica leve no poseen valores mas elevados de la citoquina que los que no tienen fibrosis.

Las variaciones en los niveles del ARN mensajero entre las tres citoquinas estudiadas y de la síntesis proteica de ellas sugiere la existencia de una desregulación en diferentes niveles.

5.2 El efecto del TGFβ sobre la agregación plaquetaria

El TGFβ tiene un importante rol en la reparación de lesiones tisulares (Roberts, 1996; O`Kane, 1997). La reparación de heridas es un proceso regulado que involucra inflamación, proliferación y migración celular, angiogenesis y producción de matriz extracelular (Clark, 1996). El TGFβ regula la mayoría de estos eventos, incluyendo la quimiotaxis de células inflamatorias (Wahl, 1987),

angiogénesis (Roberts, 1986), depósito de matriz extracelular y formación de tejido de granulación (Roberts, 1986; Clark, 1997) promoviendo así la reparación de la lesión. Las plaquetas también desempeñan una función importante en la reparación de heridas mediante su activación y liberación del contenido de sus gránulos al medio.

Dado que los pacientes con trombocitemia esencial tienen aumento del TGF β plasmático y disfunciones plaquetarias resultó de interés estudiar si esta citoquina ejerce algún efecto sobre la función plaquetaria. En primer lugar se observó por citometría de flujo que las plaquetas poseen receptor para la citoquina y que la función plaquetaria está afectada por la presencia del TGF β en el medio de incubación. Si bien el TGF β no es capaz de causar agregación plaquetaria por sí mismo, se vió que puede modular la agregación cuando se utiliza el ADP como agonista. El efecto de la citoquina sobre la agregación plaquetaria fue variable, dependiente del tiempo de incubación y de la concentración del agonista utilizado para inducir la agregación. El TGF β potencia la agregación plaquetaria cuando se utilizan plaquetas incubadas con la citoquina durante periodos largos (60 minutos) o durante periodos cortos (5 minutos) si se induce la agregación con concentraciones bajas de ADP. El mismo resultado se observa incubando la muestra con la citoquina por periodos largos, utilizando concentraciones altas de ADP para la agregación. En cambio, produce un efecto inhibitorio cuando se incuban las plaquetas con la citoquina por periodos cortos y se estimulan con concentraciones de ADP altas. Se puede hipotetizar que las

incubaciones a tiempos largos podrían equipararse a patologías donde las plaquetas se encuentran expuestas en forma continua a altos niveles de TGF β (como la trombocitemia esencial) y ante una activación plaquetaria causada por ejemplo, por un daño tisular, las plaquetas responderían en forma incrementada. La respuesta observada cuando las plaquetas son incubadas por períodos cortos en presencia de la citoquina y estimuladas luego con altas concentraciones de ADP, podría asimilarse a una respuesta hemostática fisiológica en la cual se generan altas concentraciones locales de ADP como consecuencia de la liberación de los gránulos plaquetarios. En este caso la presencia de la citoquina liberada localmente por las plaquetas podría generar una disminución de la respuesta plaquetaria, lo cual podría indicar un posible mecanismo de regulación negativa de la activación. Los pacientes con trombocitemia esencial se caracterizan por presentar anormalidades en la función plaquetaria, en ellos la agregación puede estar alterada, pueden responder en forma disminuida a los agonistas comunmente utilizados en estudios de agregación plaquetaria y pueden presentar agregación espontánea (Leoncini, 1990). El efecto del TGF β sobre las plaquetas podría ser uno de los mecanismos relacionado con las anormalidades en la función de las mismas.

El efecto causado por la citoquina sobre la agregación sería mediado por su receptor, presente en la superficie plaquetaria. Los principales receptores que transducen la señal del TGF β son los llamados de tipo I y de tipo II. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores serina/ treonina quinasa (Chiefetz,

1987). El receptor de tipo II es esencial para la unión del ligando y el de tipo I lo es para la transducción de la señal al núcleo. Ante la unión del TGF β , los receptores de tipo I y II forman un complejo junto con la citoquina, el receptor tipo II que se encuentra fosforilado en forma constitutiva en residuos serinas, se autofosforila en forma ligando dependiente también en este tipo de residuos y fosforila al receptor tipo I en residuos serina y treoninas (Wrana, 1992; Luo, 1997; Wrana, 1994). Este último, que posee actividad de serina/treonina quinasa es el que finalmente realiza la transducción de la señal *down stream* fosforilando proteínas específicas. La transducción de la señal puede ser realizada a través de diferentes caminos, entre ellos el de las MAPK y el de las Smad. La activación de estos mecanismos en la plaqueta ante la unión de la citoquina a su receptor podría estar causando el efecto observado sobre la función plaquetaria. El mecanismo por el que este efecto se lleva a cabo podría ser por una estimulación de las vías normalmente activadas por agonistas como el ADP o por una activación de proteínas específicas de la vía de transducción de señales del TGF β a través de su receptor que de manera indirecta potencia las vías ya conocidas. La ausencia de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina ante la unión de la citoquina al receptor indica que el mecanismo de acción sobre la agregación plaquetaria no es a través de una activación directa y concuerda con el hecho de que esta interacción es insuficiente para iniciar la activación plaquetaria.

Dado que la citoquina modula la función de las plaquetas, este mecanismo sería a través de la participación de manera indirecta en la vía clásica

de la activación plaquetaria o a través de la fosforilación de proteínas en residuos serina/treonina, como la vía de las Smad. La disminución de la fosforilación de dos bandas relacionadas con la agregación plaquetaria observada durante incubaciones cortas con la citoquina, sugiere la activación de un inhibidor o una tirosina fosfatasa. Estas últimas se encuentran descritas en plaquetas (Levy-Toledano, 1997). Este efecto no se observó en las incubaciones de 60 min, esto podría sugerir la presencia de un mecanismo diferente involucrando posiblemente la fosforilación de proteínas en residuos diferentes a las tirosinas, posiblemente las Smad.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron, en primer lugar, las variaciones de los niveles proteicos plasmáticos, intraplaquetarios y de expresión del PDGF, TGF β y bFGF en un grupo de 34 pacientes con trombocitemia esencial, así como también a los linfocitos y a los megacariocitos como fuentes celulares de liberación de TGF β y bFGF en el plasma y la relación de estos factores con la presencia de fibrosis medular. Los pacientes fueron estudiados antes y durante la remisión hematológica por el tratamiento con anagrelide, droga que ejerce su efecto sobre la maduración del megacariocito disminuyendo su tamaño y la ploidía celular (Mazur 1992), llevando a una reducción en la producción de plaquetas. Se estudió también, la presencia de receptores para TGF β sobre la membrana plaquetaria, el efecto del TGF β sobre la función plaquetaria y a través de que mecanismo actúa.

PDGF

Se encontró un aumento del nivel plasmático del PDGF en los pacientes sin tratamiento que se normaliza durante la remisión hematológica de la enfermedad, cuando el recuento plaquetario se reduce por el tratamiento de los pacientes con anagrelide. Los pacientes sin tratamiento que mostraron presencia de fibrosis reticulínica medular en el estudio de la biopsia tuvieron niveles mayores de esta citoquina con respecto a los pacientes sin fibrosis. En las plaquetas esta citoquina se encontró disminuida y se normalizó con la reducción del recuento plaquetario. El ARN mensajero se encontró disminuido en las plaquetas antes y durante el tratamiento.

TGFβ

Se encontró un aumento del nivel plasmático del TGFβ en los pacientes estudiados que no se modificó durante el tratamiento con anagrelide. No se encontró relación entre los niveles de esta citoquina en el plasma y la fibrosis reticulínica leve medular. En las plaquetas esta citoquina se encontró normal antes y durante el tratamiento. El ARN mensajero intraplaquetario se encontró aumentado y se normalizó durante la remisión hematológica por el tratamiento. Por inmunofluorescencia se determinó que tanto los linfocitos como los megacariocitos expresan esta citoquina y que el nivel de expresión es similar al observado en los controles.

bFGF

Se encontró un aumento del nivel plasmático y del intraplaquetario del bFGF en los pacientes sin tratamiento que disminuye, pero sin llegar a valores normales, cuando los pacientes alcanzan un recuento plaquetario normal. No se encontró relación entre los niveles plasmáticos de esta citoquina y la presencia de fibrosis reticulínica leve medular. El ARN mensajero se encontró normal tanto en los pacientes sin tratamiento como en los tratados. Por inmunofluorescencia se determinó que tanto los linfocitos como los megacariocitos expresan esta citoquina y que el nivel de expresión es similar al observado en los controles.

Receptor de TGF β

Se encontró presencia del receptor para TGF β en la membrana plaquetaria por la técnica de citometría de flujo. El número de receptores por plaqueta parece ser bajo.

Efecto del TGF β sobre las plaquetas

Se observó que el TGF β actúa sobre la agregación plaquetaria. Este efecto puede ser inhibitorio o estimulante dependiendo del tiempo de incubación de las plaquetas con TGF β y de la concentración de ADP utilizada.

Transducción de señales en la plaqueta inducidas por TGF β

Cuando se estudió la activación de proteínas a través del receptor del TGF β , inhibiendo la agregación plaquetaria, no se observó la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Cuando se evaluó el mecanismo por el cual el TGF β modula la agregación plaquetaria, se vió la disminución de la fosforilación en residuos de tirosina de dos bandas una de 100 kd y otra de 105 kd.



Paola L. V.



Felina C. Molinas

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL, TGFbeta RI phosphorylation of Smad2 on ser465 and ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 1997, 272:27, 678-85.
- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: Stem cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976, 295:913.
- Akard LP, Hoffman R, Elias L, Saiers JH. Alpha-interferon and immune hemolytic anemia (letter). *Ann Intern Med* 1986,105:306.
- Aktories K, Jacobs KH. Regulation of platelets cyclic AMP formation. In: Longenecker GL (ed) *The platelets: Physiology and pharmacology*. Academic Press, New York: 243-60, 1985.
- An E, Ogata K, Kuriya S, Nomura T. Interleukin-6 and erythropoietin act as direct potentiators and inducers of in vitro cytoplasmic process formation on purified mouse megakaryocytes. *Exp Hematol*. 1994 Feb; 22(2):149-56.
- Andes WB, Noveck RJ, Fleming JS. Inhibition of platelet production induced by a antiplatelet drug, anagrelide, in normal volunteers. *Throm Haemost* 1984, 52: 325-8.
- Andrews RK, Berndt MC. Adhesion-dependent signaling and the initiation of haemostasis and thrombosis. *Histol Histopath* 1998, 13:837-44.
- Apaja-Sarkkinen M, Autio-Harmainen H, Alavaikko M, Risteli J, Risteli L. Immunohistochemical study of basement membrane proteins and type III procollagen in myelofibrosis. *Br J Haematol* 1986, 63:571-80.
- Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike K, Kimura H, Tanioka Y, Shibuya A, Hirano T, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*. 1990; 75(8): 1602-5.

- Asoian RK, Sporn MB. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*. 1986, 102: 1217-23.
- Avraham H, Vannier E, Cowley S, Jiang SX, Chi S, Dinarello CA, Zsebo KM, Groopman JE. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):365-71.
- Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood* 1994, 83: 2126-32.
- Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000; 96:3310-21.
- Bachelot C, Cano E, Grelac F, Saleun S, Druker B, Levy-Toledano S, Fischer S, Rendu F. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. *Biochem J* 1992, 284:923-8.
- Baird A. Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotropic growth factors. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 78-86.
- Baglin TP, Price SM, Boughton BJ. A reversible defect of platelet PDGF content in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1988, 69:483-6.
- Baker RI, Manoharan A. Platelet function y myeloproliferative disorders: characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. *Eur J Haematol* 1988, 40:267-72.
- Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Bertolino G, Noris P, Ascari E. Effect of anagrelide on platelet count and function in patients with thrombocytosis and myeloproliferative disorders. *Haematologica* 1992, 77:40-3.
- Barbui T, Finazzi G, Dupuy E, Kiladjian JJ, Briere J. Treatment strategies in essential thrombocythemia: a critical apraisal of various experiences in different centers. *Leukemia and Lymphoma* 1996, 22 (supl 1): 149-60.
- Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Mol Endocrinol* 1996, 10: 1077-83.

- Baumgartner HR, Muggli R. Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantitation in vivo and in vitro. In: Gordon JL (ed) Platelets in biology and pathology. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1976, p 21-60.
- Behnke O. An electron microscope study of megakaryocytes of rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastructural Res* 1968, 24:412-33.
- Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993, 165:728-37.
- Berk PD, Goldberg JD, Silverstein MN, Weinfeld A, Donovan PB, Ellis JT, Landaw SA, Laszlo J, Najean Y, Pisciotta AV, Wasserman LR. Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N Engl J Med* 1981, 304:441-7.
- Berlin NI, Wasserman LR. Polycythemia vera: A retrospective and reprise. *J Lab Clin Med* 1997, 130:365-73.
- Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Sole F, Hernandez-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999; 13: 150-4.
- Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia rubra vera. *Sem Onc* 1995, 22:307-26.
- Blanchard KL, Gilliland DG, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders. *Am J Med Sci* 1992, 304:125-30.
- Blickstein D, Aviram A, Luboshitz J, Prokocimer M, Stark P, Bairey O, Sulkes J, Shaklai M. BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocytopenia patients: clinical presentation. *Blood*, 1997; 90: 2768-71.
- Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood reviews* 1995, 9: 143-56.
- Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962, 194: 927-9.

- Brown JD, DiChiara MR, Anderson KR, Gimbrone MA Jr, Topper JN. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999, 274: 8797-805.
- Bruno E, Cooper RJ, Wilson EL, Gabrilove JL, Hoffman R. Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of human megakaryocyte progenitor cells. *Blood* 1993, 15:82(2): 430-5.
- Bruno E, Horrigan SK, Van Den Berg D, Rozler E, Fitting PR, Moss ST, Westbrook C, Hoffman R. The Smad5 gene is involved in the intracellular signaling pathways that mediate the inhibitory effects of transforming growth factor-beta on human hematopoiesis. *Blood* 1998, 91: 1917-23.
- Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, Rifkin DB and Wilson EL. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993, 81: 631-638.
- Burgering BMT, de Vries-Smits AMM, Medema RH, van Weeren PC, Tertoolen LGJ, Bos JL. Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol* 1993, 13, 7248-56.
- Bugler B, Amalric F, Prats H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 573-77.
- Burkhardt R, Bartl R, Beil E, Demmler K, Hoffman E, Kronseder A. Myelofibrosis-osteomyelosclerosis syndrome: review of literature in histomorphology. In: *Advances in the Biosciences*. Berlin: Dahlem Workshop on myelofibrosis-Osteomyelosclerosis Syndrome, 1974: 9-54.
- Burman P, Totterman TH, Oberg K, Karlsson FA. Thyroid autoimmunity in patients on long term therapy with leukocyte-derived interferon. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63: 1086-90.
- Bursucker I, Nedeermann KM, Petty BA, Schalter B, Spitalny GL, Tepper MA, Pasternak RD: In vivo regulation of hemopoiesis by transforming growth

- factor beta 1: Stimulation of GM-CSF- and M-CSF-dependent murine bone marrow precursors. *Exp Hematol* 1992; 20:431-35.
- Caenazzo A, Pietrogrande F, Polato G, Piva E, Masiero M, Sgarabotto D and Girolami A. Changes in the mitogenic activity of platelet-derived growth factor(s) in patients with myeloproliferative disease. *Acta Hematologica* 1989, 81:131-135.
- Candia AF, Watabe T, Hawley SH, Onichtchouk D, Zhang Y, Derynck R, Niehrs C, Cho KW. Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: Intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development* 1997, 124: 4467-80.
- Carrington PA, Hill RJ, Stenberg PE, Levin J, Corash L, Schreurs J, Baker G, Levin FC. Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991, 77(1):34-41.
- Carrington PA, Hill RJ, Levin J, Verotta D. Effects of Interleukin 3 and Interleukin 6 on platelet recovery in mice treated with 5-fluorouracil. *Exp. Haematol* 1992, 20: 462-9.
- Carroll RC, Butler RG, Morris PA, Gerrard JM. Separate assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. *Cell* 1982, 30:385-93.
- Casadevall N, Vainchecker W, LaCombe C, Vinci G, Chapman J, Breton-Gorius J, Varet B. Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. *Blood* 1982, 59:447-51
- Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood* 1981, 57:781-7.
- Castro-Malaspina H, Moore MAS. Pathophysiological mechanisms operating in the development of myelofibrosis: Role of megakaryocytes. *Nouv Rev Fr Hematol* 1982, 24:221-6.
- Castro-Malaspina H, Jhannar SC: Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts. *Prog Clin Biol Res* 1984, 154:307-22 a.

- Castro-Malaspina H. Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. *Myelofibrosis and the Biology of Connective Tissue*. 1984; pp 427-54 b.
- Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and Fast-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 1997, 389:85-9.
- Chiefetz S, Weatherbee JA, Tsang ML-S, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massague J. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 1987, 48: 409-15.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9.
- Clark RAF: Overview and general consideration of wound repair. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Edited by Clark RAF. Plenum Press, New York, 1996, pp3-50.
- Clark RAF, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM: TGF- β 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol* 1997, 170:69-80.
- Cohen I, de Vries A. Platelet contractile regulation in an isometric system. *Nature (Lond)*, 1973, 246: 36-7.
- Conlon KC, Urba WJ, Smith JW II, Steis RG, Longo DL, Clark JW. Exacerbation of symptoms of autoimmune disease in patients receiving alpha-interferon therapy. *Cancer* 1990, 65: 2237-42.
- Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* 1994, 83: 99-112.
- Cortelazzo S, Viero P, Barbui T. Platelet activation in myeloproliferative disorders. *Throm Haemost* 1981; 45:211-3.

- Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero E, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythaemia. *J of Clinical Oncology* 1990, 8:556-62.
- Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero E, Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *New England Journal of Medicine* 1995, 332: 1132-6.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Trombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 1998, 93: 1159-70.
- Culter L, Rodan G, Feinstein MB. Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATP-ases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochem Biophys Acta* 1978, 542: 357-71.
- Dai CH, Krantz SB, Means RT, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera blood burst-forming units –erythroid are hypersensitive to interleukin-3. *J Clin Invest* 1991, 87:391-6
- Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1992, 80:891-9.
- Davidson JM, Broadley KN. Manipulation of the wound-healing process with basic fibroblast growth factor. *Ann NY Acad Sci* 1991, 638:306-315.
- Davis RJ. Signal transduction by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* 1998, 64, 1-12.
- De Wolff JthM, Hendriks DW, Esselink MT, Halie MR, Vellenga E. The effects of IL-1 and IL-4 on the Epo-independent erythroid progenitor in Polycythemia vera. *Br J Haematol* 1994, 88:242-6.
- Debili N, Masse JM, Katz A, Guichard J, Betron-Gorius J, Vainchenker W. Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3,

- interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood*. 1993; 82 (1): 84-95.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985, 316: 701-5.
- Donovan PB, Kaplan ME, Goldberg JD, Tatarsky I, Najean Y, Silberstein EB, Knospe WH, Laszlo J, Mack K, Berk PD, et al. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea. *Am J Hematol* 1984, 17: 329-34.
- El-Kassar N, Hetet G, Briere J, et al: Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: Advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997, 89:128-134.
- Ellis JT, Peterson P. The bone marrow in polycythemia vera. *Pathol Annu* 1979, 14: 383-03.
- Elmore MA, Anand R, Horvath AR, Kellie S. Tyrosine-specific phosphorylation of gpIIb in platelet membranes. *FEBS Lett* 1990; 269:283-7.
- Emilia G, Sacchi S, Temperani P, Longo R, Vecchi A. Progression of essential thrombocythemia to blastic crisis via idiopathic myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 1993, 9:423-26.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent Smad and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J Biol Chem* 1999, 274: 37413-20.
- Fava RA, Casey TT, Wilcox J, Pelton RW, Moses HL and Nanney LB. Synthesis of transforming growth factor- β 1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet α granules. *Blood* 1990, 76: 1946-1955.
- Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauters F. Clinical course in essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer* 1990, 66:549-556.

- Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, et al. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent cell. *Blood* 1981;58:916-919.
- Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977, 63:125-30.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987, 235:442-7.
- Foletta VC. Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunol Cell Biol* 1996, 74:121-33.
- Fox, JEB. (1987) The platelet cytoskeleton. In *Thrombosis and Haemostasis* (Vestraete M, Vermeylen J, Lijnen R, and Arnout J, Eds.) Leuven University Press, Leuven, Belgium, pp. 175-225.
- Frey RS, Mulder KM. Involvement of ERK2 and Sapk/JNK activation by TGF β in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res* 1997, 57: 628-33.
- Gale RE. Evaluation of clonality in myeloid stem-cell disorders. *Semin Hematol* 1999, 36:361-72 a.
- Gale RE. Biological heterogeneity in essential thrombocythemia and its clinical implications. *Hematology* 1999, 178-184.
- Gay S, Gay RE, Prchal JT. Immunohistological studies of bone marrow collagen. In: Berk P, Castro-Malaspina H, Wasserman LR, eds. *Myelofibrosis and biology of connective tissue*. New York: Alan R. Liss:291-306, 1984.
- Gerrard JM. Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. *Hosp Prac* 1988, 23:89-108.
- Gersuk GM, Carmei R and Pattengate PK. Platelet-derived growth factor Concentrations in platelet-poor plasma and orine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1989, 74: 2330-2334.

- Gillespie E. Anagrelide: a potent and selective inhibitor of platelet cyclic AMP phosphodiesterase enzyme activity. *Biochem Pharmacol* 1988, 37:2866-8.
- Gimbrone MA, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature (Lond)*, 1969, 221:33-6.
- Golden A, Nemeth SP, Brugge JS. Blood platelets express high levels of the pp60 c-src specific tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1986, 83:852-6.
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigert L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987, 8: 95-114.
- Gregg XT, Pahl JT: Erythropoietin receptor mutations and human disease. *Seminars in Hematology* 1997, 34:70-76.
- Gugliotta L, Marchioli R, Fiacchini M, et al: Epidemiological, diagnostic therapeutic, and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood* 1997, 90:348a (suppl, abstr)
- Hammacher A, Hellman U, Johnsson A, Ostman A, Gunnarsson K, Westermark B, Wasteson A, Heldin CH. *J. Biol Chem* 1988, 263, 16493-16498.
- Han ZC, Briere J, Abgrall JF, Sensebe L, Nedellec G, Parent D, Guern G. Spontaneous formation of megakaryocyte progenitors (CFU-MK) in primary thrombocythaemia. *Acta Haematol* 1987, 78:51-3.
- Han ZC, Belucci S, Tenza D, Caen JP. Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 and beta-thromboglobulin: Comparative analysis in bone marrow cultures from normal individuals and patients with essential thrombocythaemia and immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1990; 74: 395-401.
- Han ZC, Belucci S, Bodevin E, Wan HY, Shen ZX, Caen JP. In vivo inhibition of megakaryocyte and platelet production by platelet factor 4 in mice. *Cr Acad Sci III* 1991, 313: 553-8.

- Han ZC, Belucci S, Wan HY, Caen JP. New insights into the regulation of megakaryocytopoiesis by haemopoietic and fibroblastic growth factors and transforming growth factor beta-1. *Br J Haematol* 1992, 81:1-5.
- Harker LA. Megakaryocyte quantitation. *J Clin Invest* 1968; 47: 452-457.
- Harrison CN, Crammer EM. Platelet α -granules. *Blood Reviews* 1993,7: 52-62.
- Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, et al: Polyclonal haemopoiesis is frequent in patients diagnosed with essential thrombocythaemia. *Blood* 1997, 90:347a (suppl, abstr).
- Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990, 29, 166-72.
- Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor- β activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270:7117-24.
- Hartsough MT, Frey R, Zipfel P, Buard A, Cook S, McCormick F, Mulder KM. Altered transforming growth factor β signaling in epithelial cells when Ras activation is blocked. *J Biol Chem* 1996, 271: 22368-75.
- Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor- β signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 1997, 75:21-41.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*, 12,186-97, 1998.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The Mad-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997, 89: 1165-73.
- Hehlmann R, Jahn M, Baumann B, Kopcke W. Essential thrombocythemia: clinical characteristics and course of 61 cases. *Cancer* 1988, 61:2487-96.

- Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 1985, 39: 169-87.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997, 390:465-471.
- Heller P, Kornblihtt LI, Cuello MT, Larripa I, Najfeld V, Molinas FC. BCR-ABL transcripts may be detected in essential thrombocythemia but lack clinical significance. *Blood* 2001, 98: 1990.
- Hess G, Rose P, Gamm H, Papadileris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 1994, 88:794-02.
- Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-b induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999, 18: 1345-56.
- Holmsen H. Biochemistry of the platelet release reaction. *Ciba Foundation Symposium N° 35 (New series)*, 1975, p 175-205.
- Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O Connor MB, Attisano L, Wrana JL. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 1996; 85: 489-00.
- Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factobeta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986, 261:4337-45.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997, 389: 622-26.
- Ishibashi T, Koziol JA, Burstein SA. Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79(1):286-9.
- Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 1989, 74 : 1241-4.

- Jabaily J, Iland HJ, Laszlo J, Massey EW, Faguet GB, Briere J, Landaw SA, Pisciotta AV. Neurologic manifestations of essential thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1983, 99:513-18.
- Jackson DS. Collagen degradation in vivo and in vitro. In: *Biology of fibroblasts*, ed. by Kulonen E & Pikkarainen J. pp. 417-420. *London Academic Press*, 1973.
- Jaussen JW, Anger BR, Drexler HG, et al: Essential thrombocythemia in two sisters originating from different stem cell levels. *Blood* 1990, 75:1633-1636.
- Johnston JB, Dalal BI, Israels SJ, Oh S, McMillan E, Begleiter A, Michaud G, Israels LG, Greenberg AH. Deposition of transforming growth factor b in the marrow in myelofibrosis, and the intracellular localization and secretion of TGF b by leukemic cells. *Am J Clin Pathol* 1995, 103:574-82.
- Jullien P, Berg TM, Lawrence DA. Acidic cellular environments: activation of latent TGF β and sensitization of cellular response to TGF β and EGF. *Int J Cancer* 1989, 43: 886-91.
- Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* 1979, 53, 1043-52.
- Katoh O, Kimura A, Ithoh T and Kuramoto A. Platelet derived growth factor is decreased in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1988, 27: 276-80.
- Katoh O, Kimura A, Ithoh T and Kuramoto A. Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders. *American Journal of Hematology* 1990, 35: 145-50.
- Kaushansky. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995, 86: 419-31
- Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shatiil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. *New Engl J Med* 1978, 299:505-9

- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, Barr PJ. Ligand-affinity cloning and structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:6985-9.
- Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Progress in Growth Factor Research*, 1: 207-235, 1989.
- Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H. Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol* 1993, 83:539-44.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntyre LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996, 88:1525-41.
- Kurzrock R, Cohen PR. Erythromelalgia: review of clinical characteristics and pathophysiology. *Am J Med* 1991, 91:416-22.
- Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood* 1992, 79: 619-26.
- Kyriakis JM. Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signaling modules to extracellular stimuli and biological responses, *Biochem Soc Symp* 1998, 64, 29-48.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and Smad proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996, 383: 832-6.
- Laguna S, Correa G, Marta RF, Kornblihtt L, Riveros D, Petrone M, Molinas FC. Platelet function and response to anagrelide treatment in essential thrombocythemia. (Abstract) *Haemostasis* 1996, 26:571a.
- Laguna MS, Marta RF, Kornblihtt LI, Santander P, Fabbro D, Molinas FC. Coexistencia de hiporreactividad y de activación plaquetaria en la trombocitemia esencial. *Rev Iber Hemost Tromb* 1997, 10 (supl 1) : 87-91.
- Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F, Praloran V, Dupriez B, Demory JL, Jasmin C, Martyre M-C. Differential expression of transforming growth factor b , basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells

- from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood* 1996, 88:4534-46.
- Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL, et al.: Missense mutation of the receptor is a rare event in known eruthroid malignancies. *Blood* 1996, 87:1502-1511.
- Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP Kinases (p42MAPK and p44MAPK) but not their activator MAP Kinase Kinase (p54MAPKK) in fibroblast. *J Cell Biol.* 1993, 122, 1079-88.
- Leoncini G, Maresca M, Bussi E, Piana A, Armani U. Platelets of patients affected with essential thrombocythemia are abnormal in plasma membrane and adenine nucleotide content. *Eur J Haematol* 1990, 44:115-9.
- Lévy-Toledano S. Platelet signalling: an exquisite coordination of several integrated networks. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1997, 10, 1:27-33.
- Lévy-Toledano S, Macluof J, Rosa JP, Gallet C, Valles G, Nurden P, Nurden A. Abnormal tyrosine phosphorylation linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. *Throm Haemost* 1998, 80: 463-8.
- Liu XL, Yue JB, Frey RS, Zhu QC, Mulder KM. Transforming growth factor β signaling through Smad 1 in human breast cancer cells. *Cancer res* 1998, 58: 4752-7.
- Luo K X, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF β receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J*, 1997, 16, 1970-81.
- Mac Intyre DE. The platelet release reaction: association with adhesion and aggregation amd comparasion with secretory responses in other cells. In: Gordon JL (ed) *Platelets in biology and pathology*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1976, p 61-85.

- Mahadevappa VG, Holub BJ. Diacylglycerol lipase is a minor source of released arachidonic acid in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 1986, 134: 1327-33.
- Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: Multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993, 7: 516-22.
- Marquardt B, Frith D, Stabel S. Signaling from TPA to MAP Kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signaling pathway *in vitro*. *Oncogene* 1994, 9: 3213-18.
- Marta Rosana, Vassallu Patricia, Molinas Felisa. Plasmatic levels of cytokines and growth factors in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 1998 ; Abst P1246.
- Martin JF, Levine RF. Evidence in favour of the lungs and against the bone marrow as the site of platelet production. In: Page C P (ed) *The platelet in health and disease*. 1991, Blackwell Scientific Oxford p 1-9.
- Martin JM, Gandhi K, Jackson WR, Dessypris EN. Hypersensitivity of polycythemia vera megakaryocytic progenitors to thrombopoietin. *Blood* 1996, 88: 97a.
- Martyré MC, Magdelenat H, Bryckaert MC, Laine-Bidron C and Calvo F. Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British Journal of Haematology* 1991, 77: 80-86.
- Martyré M-C, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Benyahia B, Dupriez B, Demory JL, Bauters F. Transforming growth factor- β and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Brit J Haemat* 1994; p88:9-16.
- Martyré MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL and Dupriez B. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *British Journal of Haematology* 1997, 97: 441-448.
- Massagué J. Receptors for TGF- β family. *Cell* 1992, 69: 1067-70.

- Massagué J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994, 4:172-8.
- Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF β /Smad signaling system. *EMBO J* 2000, 19: 1745-54.
- Mazur EM, Cohen JL, Bogart L. Growth characteristics of circulating hematopoietic progenitor cells from patients with essential thrombocythemia. *Blood* 1988, 71:1544-50.
- Mazur EM, Rosmarin AG, Sohl PA, Newton JL and Narendram A. Analysis of the mechanism of anagrelide-induced thrombocytopenia in humans. *Blood* 1992, 79: 1931-1937.
- McCarthy DM. Fibrosis of the bone marrow: Content and causes. *Br J Haematol* 1985, 59:1-7.
- McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984, 259:9799-804.
- McLaughlin P, Talpaz M, Quesada JR, Saleem A, Barlogie B, Gutterman JU. Immune thrombocytopenia following alpha-interferon therapy in patients with cancer. *JAMA* 1985, 254: 1353-4.
- Michiels JJ, Van Joost T. Erythromelalgia and thrombocythemia: a causal relation. *J Am Acad Dermatol* 1990, 22:107-11.
- Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, Van Vliet HHDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993, 43:1107-10.
- Mirza AM, Correa PN, Axelrad AA. Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor β subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. *Blood* 1995, 86:877-82.
- Mooradian DL, Lucas RC, Weatherbee JA, Furcht LT. Transforming growth factor β 1 binds to immobilized fibronectin. *Journal of Cellular Biochemistry* 1989, 41, 189-200.

- Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement for ras protooncogene function during serum stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 1985, 313: 241-3.
- Mulder KM, Morris SL. Activation of p21ras by transforming growth factor β in epithelial cells. *J Biol Chem* 1992, 267:5029-31.
- Mulder KM. Role of Ras and MAPKs in TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000, 11: 23-35.
- Muller EW, de Wolff JthM, Hendriks DW, Esselink MT, Halie MR, Vellenga E. Recombinant human mast cell growth factor supports erythroid colony formation in Polycythemia vera in the presence and absence of erythropoietin and serum. *Exp Hematol* 1993, 21:1353-7.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 1997, 51:1376-82.
- Murphy S, Hand H, Rosental D, Lazlo J. Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group. *Sem Haematol* 1986, 23:177-82
- Murphy S, Peterson P, Lland H and Lazlo J. Experience of Polycythemia Vera Study Group With Essential Thrombocythemia: A final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Seminars in Hematology* 1997, 34: 29-39.
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGFbeta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad 3 and Smad4. *EMBO J* 1997, 16: 5353-62 a.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997, 389: 631-5 b.

- Neben TY, Loebelenz J, Hayes L, McCarthy K, Stoudemire J, Schaub R, Goldman SJ. Recombinant human Interleukin-11 stimulates megakaryocytopoiesis and increases peripheral platelets in normal and splenectomized mice. *Blood* 1993, 81: 901-8
- Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl A, Sheridan WP, Ohashi H, Kato T, Li YS, Bartley TD, Choi E, Bogenberger J, et al. Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1995, 95: 2973-8.
- Niewiarowski S, Paul D. Platelet granule proteins with mitogenic and antiheparin activity. In Gordon JL (ed) *Platelets in biology and pathology* 2. Elsevier/North Holland, Amsterdam 1981, p 91-106.
- Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* 1998, 273: 1872-9.
- Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins and their clinical aspects. In: *Thrombosis and Haemostasis* (Verstraete M, Vemynen J, Lijnen R, Arnout J, Eds. Leuven University Press, Leuven, Belgium, pp 93-125.
- O'Kane S, Ferguson MWJ: Transforming growth factor β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29:63-78.
- Oliver LJ, Rifkin DB, Gabilove J, Hannocks MJ and Wilson EL. Long-term culture of human bone marrow stromal cells in the presence of basic fibroblast growth factor. *Growth factors* 1990, 3: 231-236.
- Ostman A, Backstrom G, Fong N, Betsholtz C, Wernstedt C, Hellman U, Westermark B, Valenzuela P, Heldin CH. Expression of three recombinant homodimeric isoforms of PDGF in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for difference in receptor binding and functional activities. *Growth Factors* 1989, 1:271-81.

- Ottmann OG, Pelus LM. Differential proliferative effects of transforming growth factor- β on human hematopoietic progenitor cells. *The Journal of Immunology*, 140: 2661-2665, 1988.
- Overall CM, Wrana JL and Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72 kDa-progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *Journal of Biological Chemistry* 1989, 264: 1860-1869.
- Pahl HL. Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 2000, 267: 3395-401.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J and Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO Journal*, 7: 2977-2981, 1988.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood* 1988; 71:831-43.
- Pischell KD, Bluestein HG, Woods VL. Platelet glycoproteins Ia, Ic and IIa are physiochemically indistinguishable from the very late antigens adhesion-related proteins of lymphocytes and other cell types. *J Clin Invest* 1988, 81:505-13.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL and Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- β . *Journal of Experimental Medicine*, 165: 251-256, 1987.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in the platelet adhesion to vascular subendothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 148: 1482-89.
- Randi ML, Barbone E, Zerbinati P, Soini B, Rossi C, Girolami A. Essential thrombocythemia following polycythemia vera: An unusual sequence. *J Med* 1996, 27:363-8.

- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 1991, 252:1705-8.
- Raskind WH, Jacobson R, Murphy S, et al: Evidence for the involvement of B lymphoid cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J clin Invest* 1985, 75:1388-1390.
- Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, Kahari VM. Transforming growth factor- β induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblast via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999, 274: 37292-300.
- Regev A, Stark P, Blickstein D, Lahav M. Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts. *Am J Hematol* 1997, 56:168-72.
- Reilly JT. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: present status and future directions. *Br J Haematol* 1994; 88:1-8.
- Reilly JT, Brindley L, Kay M, Fielding S, Kennedy A, Dolan G, Smith A. Bone marrow and serum connective tissue polypeptides in idiopathic myelofibrosis. *Clin Lab Haematol* 1995, 17:35-9.
- Rendu F, Eldor A, Grelac F, Levy-Toledano S, Levitzki A. Blood coagulation fibrinolysis 1991, 1:713-16.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine VI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH and Fausi AS. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, 83: 4167-4171.
- Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor - β . *The Molecular and Cell Biology of Wound Healing (Section Edition)*. Edited by Clark RAF, Plenum Press, New York, 1996, pp 275-308.

- Rondeau E, Solal-Celigny P, Dhermy D, Vroclans M, Brousse N, Bernard JF, Boivin P. Immune disorders in agnogenic myeloid metaplasia: relation to myelofibrosis. *British J Haematol* 1983, 53: 467-75.
- Rosa JP, Arteanuthurry V, Grelac F, Macluof J, Caen JP, Levy-Toledano S. Reassessment of protein tyrosine phosphorylation in thrombasthenic platelets: evidence that phosphorylation of cortactin and of 64kDa protein is dependent on thrombin activation and integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *Blood* 1997, 89(12):4385-92.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986, 46:155-69.
- Roth GJ. Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucin-rich glycoproteins. *Blood* 1991, 77: 5-19.
- Rozman C, Giralt M, Feliu E, Rubio D, Cotes MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991, 67: 2658-63.
- Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J* 1993, 7: 308-16 a.
- Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993, 70: 119-23 b.
- Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemostas* 1997; 78:611-16.
- Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate bind basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988, 107:743-51.
- Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL and Madri JA. Expression of transforming growth factor B type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor B2. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 13567-13572.
- Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, Woods VL. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem Biophys Res Comm* 1988, 153:217-23.

- Schick BP. Neutral lipids. In: Platelet responses and metabolism II (Holmsen, H., ed.) CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp. 255-77, 1986.
- Segarini PR, Seyedin SM. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- β contains glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 1988, 263: 8366-70.
- Seiss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989, 58-178.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* 1998, 94: 585-94
- Silverstein MN. The evolution into and the treatment of late stage polycythemia vera. *Semin Hematol* 1976, 13:79-84.
- Silverstein MN, Pettit RM, Solberg LA, Fleming JS, Knight RC, Schacter LP. Anagrelide a new drug for treating thrombocytosis. *New England Journal of Medicine* 1988, 318:1292-4.
- Solberg LA, Oles KJ, Tarach JS, Silverstein MN, Pettitt RM, Schacter L, Fleming J. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis (abstract). *Blood* 1989, 74 suppl 1: 20 a.
- Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH. Phosphorylation of ser465 and ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* 1997, 272: 28, 107-115.
- Spencer CM, Brogden RN. Anagrelide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the treatment of thrombocythemia. *Drugs* 1994, 47:809-22.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1987, 105: 1039-45.
- Stabland BE, Heagan BM, White JG. Uptake of calcium by platelets relaxing factor. *Nature* 1969, 223: 521-22.

- Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adhesion. *Blood* 1985, 65: 85-90.
- Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jaques YV, Bainton DF. A platelet α -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985, 101: 880-6.
- Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells* 1989, 15: 23-47.
- Suzuki H, Nakamura S, Itoh Y, Tanaka T, Yamazaki H, Tanoue K. Immunocytochemical evidence for the translocation of α -granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) of human platelet to the surface membrane during the release reaction. *Histochem* 1992, 97: 381-8.
- Swart SS, Wood JK, Barnett DB. Differential labelling of platelet α_2 -adrenoceptors by 3H dihydroergocryptine and 3H yohimbine in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1984, 40:623-9
- Tahara T, Usuki K, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urame A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematopietic disorders. *Br J Haemat* 1996, 93:783-8.
- Taksin AL, Le Couedic JP, Dusanter-Fourt I, Masse A, Giraudier S, Katz A, Wendling F, Vainchenker W, Casadevall N, Debili N. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood* 1999, 93:125-39.
- Tapiale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 1997, 11: 51-59.
- Tefferi AS, Silverstein MN, Noel P: Agnogenic myeloid metaplasia. *Semin Oncol* 1995, 22:327-33.

- Tefferi A, Murphy S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *Blood Reviews* 2001, 15: 121-31 a.
- Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc* 2001; 76:22-8. b
- Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PVR-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000, 95: 2569-76.
- Ten Dijke P, Heldin CH. An anchor for activation. *Nature (London)* 1998, 397: 109-11.
- Terui T, Niitsu Y, Mahara K, et al. The production of transforming growth factor- β in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood*, 75: 1540-1548, 1990.
- Thiele J, Kuemmel T, Sander C and Fisher R. Ultrastructure of the bone marrow tissue in so-called primary (idiopathic) myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid Metaplasia). 1. Abnormalities of megakaryopoiesis and thrombocytes. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1991, 23: 93-107.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich, Diehl V. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 2000; 85:1126-34.
- Thiery JB et al *CR Acad Sci* 242: 290, 1956 a.
- Thiery JB et al *Rev Hemat* ii, 162, 1956 b.
- Titius BR, Thiele J, Schaefer H, Kriepe H, Fischer R. Ki-S1 and proliferating cell nuclear antigen expression of bone marrow macrophages. *Acta Haematol* 1994, 91:144-9.
- Tomer A. Effects of anagrelide on in vivo megakaryocyte proliferation and maturation in essential thrombocythemia. *Blood* 2002, 99 (5) 1602-9.

- Trowbridge E, Martin JF, Slater DN. Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thrombosis Reserch*, 1982, 28: 461-475.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad 2 to the TGFb receptor. *Cell* 1998, 95:779-91.
- Turhan AG, Cashman JD, Eaves CJ, et al: Variable expression of features of normal and neoplastic stem cells in patients with thrombocytosis. *Br J Haematol* 1992, 82:50-57.
- Usuki K., Iki S., Endo M., Izutsu K., Inoue K., Nishimura T. and Urabe A. Influence of thrombopoietin on platelet activation in myeloproliferative disorders. *Br J Haemat* 1997, 97:530-37
- Van Oost BA. Acid hydrolase secretion. In: *Platelet responses and metabolism II* (Holmsen, H, Ed). CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, 1986, pp 163-91.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor- β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84: 5788-5792.
- Ward HP, Block MH. The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with myeloproliferative syndrome. *Medicine (Baltimore)* 1971, 50:357-420.
- Watanabe TK, Suzuki M, Omori Y, Hishigaki H, Horie M, Kanemoto N, Fujiwara T, Nakamura Y, Takahashi E. Cloning and characterization of a novel member of the human Mad gene family (MADH6). *Genomics* 1997, 42: 446-51.
- Wehmeier A, Sudhoff T, Meierkord F. Relation of platelet abnormalities to thrombosis and hemorrhage in chronic myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost* 1997, 23:391.

- Wehmeier A, Sudhoff T. Elevated plasma levels of basic fibroblast growth factor in patients with essential thrombocythemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 1997, 98: 1048-53 b.
- While JG. Platelet microtubules and microfilaments: effects of cytochalasin B on structure and function. In: J Caen (ed) *Platelet Aggregation*. Paris: Masson, 1971: 15-52.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996, 74, 589-607.
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Weidmann A. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translation. *Nature* 1994, 370: 434-40.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X-F, Massagué J. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992, 71: 1003-14.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature (London)* 1994, 370, 341-7.
- Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor β -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 1997, 17, 7019-28.
- Yoeman LC. An autocrine model for cell-and-matrix-associated fibroblast growth factor. *Oncol Res* 1993, 5: 489-99.
- Yue J, Harstsough MT, Frey RS, Frielle T, Mulder KM. Cloning and expression of Rat Smad1: regulation by TGF- β and modulation by the Ras/MEK pathway. *J Cell Physiol* 1999, 178: 387-396. a
- Yue J, Frey RS, Mulder KM. Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGF β . *Oncogene* 1999, 18:2033-7. b
- Yue J, Mulder KM. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor β 1 production in a smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000, 275: 30765-73.

- Yue J, Mulder KM. Transforming growth factor- β signal transduction in epithelial cells. *Pharmacology and Therapeutics* 2001; 91:1-34.
- Zauli G, Visani G, Catani L, Vianelli N, Gugliotta L and Capitani S. Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor- β 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythemia. *British Journal of Haematology* 1993, 83: 4-20.
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998, 1,611-7.
- ZhangY, Musci T, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol* 1997, 7:270-6.

Figuras

Nicolas O. Fortunel, Antoinette Hatzfeld, and Jacques A. Hatzfeld. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2022-36. Review.

. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews Cancer* 2; 537-543 (2002); doi:10.1038/nrc844