



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SUPRESION DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS MEDIADA POR OXIDO NITRICO

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
EN EL AREA CIENCIAS BIOLÓGICAS**

AUTOR: ROBERTO GABRIEL POZNER
DIRECTOR: DRA. MIRTA ANA SCHATTNER



LABORATORIO TROMBOSIS I.
DEPARTAMENTO DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
“MARIANO R. CASTEX”.
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE BUENOS AIRES.

Buenos Aires, 2005.

Supresión de la Megacariocitopoyesis Mediada por Oxido Nítrico

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó el efecto del óxido nítrico (ON) sobre la proliferación de megacariocitos (MCs). Células mononucleares (CMN) o CD34⁺ fueron cultivadas en medio líquido en presencia de nitroprusiato de sodio (NPS), 2,2'-(Hidroxinitrosohidracino)bis-etanamina (DETA/ON) o 1-propil-1'-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-nitrosohidrazina (PAPA/ON) y luego estimuladas con trombopoyetina. El número de MCs disminuyó por el tratamiento con los dadores de ON. La estimulación de CMN o células CD34⁺ con factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o interferón- γ (IFN- γ) incrementó los niveles endógenos de ON y suprimió el crecimiento de MCs. Además, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de ON revirtió parcialmente la inhibición del crecimiento de MCs inducida por TNF- α e IFN- γ aunque el incremento de los niveles de ON fue completamente suprimido. El análisis del contenido de ADN por citometría de flujo demostró que la apoptosis es el mecanismo asociado con el efecto citotóxico del ON.

El tratamiento de MCs con ON promovió un aumento en los niveles de GMPc y establecimos el rol central de este segundo mensajero durante la apoptosis de MCs mediante diversas estrategias farmacológicas para modular sus niveles intracelulares. Además, los MCs tratados con PAPA/ON mostraron un aumento tanto en la expresión del fragmento activo de caspasa-3 como de su actividad biológica y paradójicamente aumentó la expresión de Bcl-xL. Por otra parte, el ON no fue capaz de modular la formación de proplaquetas ni la producción de plaquetas en cultivo pero si de inhibir la adhesión de MCs a células endoteliales.

Estos hallazgos en conjunto señalan al ON como un regulador negativo de la megacariocitopoyesis.

PALABRAS CLAVES: Megacariocitos, apoptosis, óxido nítrico, caspasas, Bcl-xL.

Megakaryopoiesis Suppression Mediated by Nitric Oxide

ABSTRACT

In the present work it was analyzed the effect of nitric oxide (NO) on megakaryocyte (Mk) proliferation. Mononuclear (MNCs) and CD34⁺ cells were cultured in liquid medium in the presence of sodium nitroprusside (SNP), 2,2'-(Hydroxynitrosohydrazino)*bis*-ethanamine (DETA/NO) or 1-propyl-1'-(3-aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazine (PAPA/NO) and then stimulated with thrombopoietin. Mk number decreased after treatment with all NO donors. Stimulation of MNCs or CD34⁺ cells with tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) increased endogenous NO levels and suppressed Mk growth. Besides, treatment with NO synthesis inhibitors partially reversed Mk growth inhibition induced by TNF- α and IFN- γ , although increased NO levels returned to normal values. DNA analysis by flow cytometry showed that apoptosis is the mechanism associated with the cytotoxic NO effect.

Mk treatment with PAPA/ON promoted an increase in the cGMP intracellular levels and it was established the leading role of this second messenger in Mk apoptosis by using several pharmacological strategies to modulate its levels. Besides, Mk treatment with PAPA/NO caused an increase not only in the caspase-3 active fragment expression but also in its activity and, paradoxically enhanced the expression of Bcl-xL. On the other hand, NO failed to modulate neither proplatelet formation nor platelet production in culture but it inhibited MC adhesion to endothelial cells.

Taken together, these findings point NO as a negative regulator of megakaryopoiesis.

KEYWORDS: Megakaryocytes, apoptosis, nitric oxide, caspases, Bcl-xL.

AGRADECIMIENTOS.

A Mirta por haberme dirigido y orientado en las tareas de investigación y por su enorme ayuda y apoyo que en diferentes momentos y de diferentes maneras ha sabido darme. Además, por enseñarme que es posible transformar la adversidad en incontables caballos de fuerza para sortear cualquier obstáculo. Un **EJEMPLO** de vida.

A Ricardo, por su gran ayuda a lo largo de todos estos años. También agradezco a Andy y Nico por prestarme a su mamá algunos ratos.

A La Sole, porque además de estar en la misma mesada diariamente compartimos hermosas comedias musicales, terribles peleas, nerviosos congresos y alentadores resultados. A Pao, siempre dispuesta a dar una mano. Naty y Elisa con su nueva y estimulante frescura. También a Sarita de quien conservo los mejores recuerdos.

A toda la gente del Departamento de Hemostasia y Trombosis desde la Dra. María Lazzari hasta Gladys, en particular a Susana, Fabiana, Alicia, Laura, Katy y Cristina. También, mi agradecimiento para los integrantes de las secciones inmunológicas de los pisos 1 (en especial a Vero, Paula, Susana y Martita), 2 y 3 del Instituto.

A los Dres. Oscar Torres, Andrés Pasqualini, Patricio Salonia y Guillermo Belucci y a todo el personal paramédico por su desinteresada colaboración en la toma de muestras.

A Laura por su amor de cada día y su respaldo incondicional en todos estos años.

A Mica y sus “megacarozos” por enseñarme acerca del amor de y para un hijo.

Al bebé que ya desde la panza deja sentir su compañía.

A mis padres por su inmenso legado. A Maru, Ale y Jero. A mi querida segunda familia Krevneris, a la familia Fernández, a mis amigos por estar siempre ahí cerca.

INDICE.

Abreviaturas	8
Introducción	9
1.1. Megacariocitopoyesis (MCp)	10
1.1.1. Identificación de los diferentes estadios por marcadores de membrana	14
1.2. Estructura del megacariocito (MC)	15
1.3. Regulación de la MCp	16
1.3.1. c-Mpl	17
1.3.2. Trombopoyetina (TPO)	18
1.3.3. Mecanismos de señalización que regulan la MCp	20
1.4. Oxido nítrico (ON)	22
1.4.1. Generación enzimática de ON	23
1.4.2. Regulación de la actividad de las NOS	27
1.4.3. Inhibidores de las NOS	28
1.4.4. Generación no enzimática de ON	28
1.4.5. El ON como mediador biológico	30
1.4.5.1. Modulación del tono vascular	30
1.4.5.2. Inhibición de la adhesión, agregación y reclutamiento de plaquetas	32
1.4.5.3. Regulación de la hematopoyesis por ON	34
1.4.5.4. Regulación de otros sistemas	36
1.5. Muerte celular programada o apoptosis	36
1.5.1. Consideraciones generales	36
1.5.2. Alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas	38
1.5.3. Caspasas	40
1.5.4. Vías de activación del proceso apoptótico	43
1.5.5. Proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2	44
1.5.6. Señales de sobrevida	47
Objetivos Generales	48
Objetivos Específicos	50

Materiales y Métodos	52
3.1. Médula ósea	53
3.1.1. Aislamiento de células mononucleares (CMN)	53
3.1.2. Purificación de células CD34 ⁺	53
3.1.3. Expansión de MCs	54
3.2. Cordón umbilical humano	55
3.2.1. Aislamiento de CMN	55
3.2.2. Purificación de células CD34 ⁺	55
3.2.3. Expansión de MCs	56
3.2.4. Purificación de MCs	58
3.3. Inmunomarcación celular para análisis por citometría de flujo	59
3.3.1. CD34	59
3.3.2. CD41 y 42b	60
3.3.3. Análisis por citometría de flujo	61
3.4. Apoptosis	61
3.4.1. Cambios morfológicos y viabilidad celular	62
3.4.2. Hipodiploidía	63
3.4.3. Expresión de caspasa-3 activada	63
3.4.4. Determinación de la actividad de caspasa-3	64
3.4.5. Determinación de Bcl-xL	65
3.5. Determinación de nucleótidos cíclicos	65
3.6. Detección de productos generados por el metabolismo del óxido nítrico	65
3.7. Formación de plaquetas en cultivo	66
3.8. Determinación de MCs formadores de proplaquetas	67
3.9. Adhesión de MCs a células endoteliales (CE)	67
3.9.1. Cultivo de CE	67
3.9.2. Identificación de CE	68
3.9.3. Marcación de MCs con ⁵¹ Cr	69
3.9.4. Ensayos de adhesión de MCs a CE	70
3.10. Análisis estadístico	71
Diseño Experimental	72

Resultados	73
4.1. Inhibición del crecimiento MCs por Dietilentetraamina NONOato (DETA/ON)	74
4.2. Inhibición del crecimiento de MCs por nitroprusiato de sodio (NPS)	76
4.3. Efecto del NPS sobre el crecimiento de MCs inducido por interleuquina-3	77
4.4. Rol del ON endógeno en la proliferación de MCs	78
4.5. Efecto del DETA/ON sobre el crecimiento de MCs derivados de células CD34 ⁺	80
4.6. Rol del ON endógeno en la proliferación de MCs derivados de células CD34 ⁺	81
4.7. Efecto del agregado de DETA/ON en diferentes tiempos luego de la estimulación de células CD34 ⁺ con TPO	83
4.8. El DETA/ON induce la muerte celular programada de células CD34 ⁺ y MCs	84
4.9. Efecto del 8-Br-GMPc en la apoptosis de MCs inducida por ON	86
4.10. Apoptosis inducida por ON sobre MCs derivados de células CD34 ⁺ de sangre de cordón umbilical	87
4.11. Mecanismos involucrados en la muerte de MCs inducida por ON	89
4.11.1. Rol del GMPc en la apoptosis de MCs inducida por ON	89
4.11.2. Activación de caspasa-3	93
4.11.3. Regulación de Bcl-xL	95
4.12. La TPO previene la apoptosis de MCs inducida por ON	96
4.13. Efecto del ON en otras etapas de la MCp	98
4.13.1. Rol del ON en la formación de proplaquetas y plaquetas en cultivo	98
4.13.2. Inhibición de la adhesión de MCs a células endoteliales por ON	101
Discusión y conclusiones	103
Perspectivas	116
Publicaciones parciales del trabajo realizado y reunido durante esta Tesis	118
Referencias bibliográficas	120

ABREVIATURAS.

8-pCPT-GMPc: 8-(4-Clorofeniltio)-3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina

8-Br-GMPc: 8-Bromo-3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina

Ac-DEVD-pNA: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida

AA: Aminoácidos

AcMo: Anticuerpo monoclonal

BFU-MK: *Burst Forming Units-MK* o unidad formadora de colonias megacariocíticas en estallido

BH4: (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

BSA: Albúmina sérica bovina

Ca⁺⁺: Calcio

CaM: Calmodulina

CE: Célula endotelial

CFU-MK: *Colony Forming Units-MK* o unidad formadora de colonias megacariocíticas

DETA/ON: 2,2'-(Hidroxinitrosohidracino)bis-etanamina

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTT: Ditritiotreitol

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGTA: Acido etilenglicol-bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* o Ensayo inmunoabsorbido unido a una enzima

ERK 1/2: *Extracellular-signal-regulated kinase 1/2* o Quinasas reguladas por señales extracelulares

ES: Error estándar

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FMN: Flavín mononucleótido

FSC: *Forward-Side Scatter* o Patrón de luz hacia adelante

GP: Glicoproteína

IFN-γ: Interferón-γ

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IP: Ioduro de propidio

kDa: kiloDalton

L-NMMA: N^G-Monometil-L-arginina

L-NAME: N^G-Nitro-L-arginina-Metil Ester

LPS: Lipopolisacáridos

MAPK: *Mitogen activated protein kinase* o Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK: *Mitogen-activated protein/ERK kinase* o Quinasa de ERK 1/2

MC: Megacariocito

MCp: Megacariocitopoyesis

NADP: Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

NPS: Nitroprusiato de Sodio

ON: Oxido Nítrico

PAPA/ON: 1-propil-1'-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-nitrosohidrazina

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Ficoeritrina

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa

SDM: Sistema de demarcación de membrana

SSC: *Side-Side Scatter* o Patrón de luz ortogonal

SCF: factor de crecimiento de células madres

TGF-β: Factor transformador del crecimiento-β

TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α

TPO: Trombopoyetina

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

1.1. Megacariocitopoyesis

La hematopoyesis, o formación de nuevas células sanguíneas, consiste en una serie de eventos a través de los cuales una célula madre pluripotencial o *stem cell* es capaz de dar origen a todos los linajes sanguíneos que, en el ser humano adulto, tiene lugar en la médula ósea. Las *stem cell* carecen, por lo tanto, de especificidad para linaje alguno pero poseen la capacidad de autorrenovarse. A medida que son estimuladas por una serie de factores hematopoyéticos pierden dicha capacidad y se convierten en progenitores comisionados, que luego de sucesivos estadios de diferenciación, dan origen a todas las poblaciones celulares constituyentes del tejido sanguíneo [1].

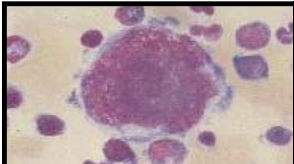
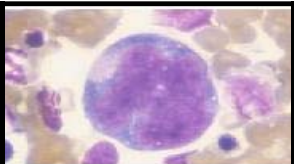
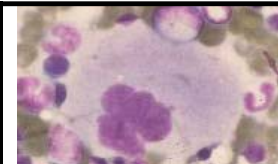
La megacariocitopoyesis (MCp), o proceso por el cual precursores megacariocíticos proliferan y maduran para dar lugar a la formación de plaquetas, puede ser dividida en dos etapas. La primera está constituida por progenitores megacariocíticos cuya función principal es amplificar el número de estas células en la médula. A su vez, se han podido identificar dos tipos de progenitores en base a su densidad y velocidad de sedimentación, el tipo de colonias que desarrollan en cultivos semisólidos y el tiempo en que tardan en desarrollarlas. El representante más temprano se denomina unidad formadora de colonias megacariocíticas en estallido o BFU-MK (del inglés *Burst Forming Units-MK*) [2]. Estas células requieren de aproximadamente 21 días para desarrollar colonias compuestas por 40 a 500 células de aspecto heterogéneo y con múltiples agrupamientos. El otro precursor, representante de un estadio de diferenciación más avanzado, se conoce como unidad formadora de colonias megacariocíticas o

CFU-MK (del inglés *Colony Forming Units-MK*) [3, 4]. A diferencia de las BFU-MK, estos progenitores luego de 10-12 días de cultivo desarrollan colonias de aspecto más homogéneo que contienen entre 3 y 32 células.

En la segunda etapa de la MCp pueden identificarse células “morfológicamente diferenciables” ya que adquieren características que permiten su distinción microscópica utilizando tinciones histológicas convencionales. Estas células ya han perdido su capacidad proliferativa y representan entre el 0,02 y 0,05 % de las células nucleadas de médula ósea y el 0,001% de las de sangre periférica. Es en esta etapa que ocurre un fenómeno sin parangón dentro de la hematopoyesis en el cual la replicación del ADN continúa pero, en contraste con los estadios proliferativos previos, no ocurre ni cito ni cariocinesis. Se produce entonces un proceso que se denomina “endomitosis A” donde las células no desarrollan ni la anafase B, ni la telofase y la subsiguiente citocinesis, fases terminales de una mitosis normal [5, 6]. Ha sido demostrado que la segregación asimétrica de los cromosomas conduce a la poliploidización de MCs aunque el mecanismo molecular responsable de este fenómeno aún no ha sido esclarecido [7]. En consecuencia, al final de la MCp, se obtienen células de gran tamaño con un núcleo grande, multilobulado y poliploide. La ploidía media de los MCs humanos normales es de 16N observándose casos excepcionales de hasta 128N. Aunque se sabe que la principal consecuencia de la poliploidización de los MCs es aumentar el tamaño celular para favorecer la producción de plaquetas, también ha sido sugerido que el nivel de ploidía puede modificar el tamaño y la función de las mismas [8].

Las células que componen esta segunda etapa han sido divididas en tres estadios (Cuadro 1). Los MCs del estadio I, o megacarioblastos, presentan la mayor relación núcleo/citoplasma, su núcleo es compacto y el citoplasma es basófilo debido al alto contenido de ARN y al escaso contenido granular. Estas células sintetizan ADN y comienzan a realizar endocitosis. Los MCs del segundo estadio, o promegacariocitos, presentan una reducción en la relación núcleo/citoplasma como resultado de un citoplasma más grande con mayor contenido de organelas y se desarrolla el denominado sistema de demarcación de membrana (SDM). Se presume que en esta etapa culmina la última endomitosis y cesa la síntesis de ADN. Finalmente, el último estadio de este grupo es el MC propiamente dicho, que posee el mayor tamaño de los tres, abundantes gránulos eosinófilos citoplasmáticos y el SDM completamente desarrollado [1].

Cuadro 1. Características diferenciales entre los MCs morfológicamente reconocibles.

			
	Etapa I Promegacarioblasto	Etapa II Megacarioblasto	Etapa III Megacariocito
Núcleo	No lobulado	Lobulado	Lobulado o cromatina densa
Frecuencia	~ 19%	~ 25%	~ 56%
Tamaño	10-12 μm	15-30 μm	30-50 μm
Citoplasma	Basófilo Sin gránulos	Gránulos azurófilos localizados	Gránulos azurófilos
Relación Núcleo/Citoplasma	> 1	Aprox. 1	< 1

El número total de MCs en la médula ósea de un ser humano adulto normal es aproximadamente 4×10^7 células [9]. Los MCs también pueden encontrarse en el torrente sanguíneo [10]. Estudios realizados en la circulación pulmonar han demostrado que en la arteria pulmonar existe un número mayor de MCs respecto de la vena, y se ha sugerido que estas células entrarían normalmente en circulación hacia el fin de su ciclo de vida para establecerse en el pulmón donde eventualmente liberarían plaquetas [11, 12].

Si bien ya en 1906 se había postulado que las plaquetas eran pequeños fragmentos del citoplasma de MCs [13] aún hoy no está claro de qué manera ocurre dicha fragmentación. Al respecto, existen dos teorías acerca de la formación de plaquetas representadas en dos modelos:

- El modelo estático postula que dentro del citoplasma del MC se van delineando territorios. A medida que el MC madura se van generando subterritorios cada vez más pequeños hasta quedar del tamaño de plaquetas las cuales son liberadas en la médula ósea por fragmentación [14].
- El modelo fluido se basa en la emisión de filamentos largos a partir del SDM que se denominan proplaquetas. Estas estructuras se van bifurcando y entran al torrente circulatorio de la médula donde se fragmentan y liberan plaquetas funcionales [15, 16].

1.1.1. Identificación de los diferentes estadios por marcadores de membrana

Los distintos estadios de la MCp pueden identificarse por la expresión diferencial de moléculas específicas en la membrana plasmática de las células. Mientras que todos los progenitores comisionados junto con las *stem cells* expresan CD34, las BFU-MK expresan, además, CD110 y las CFU-MK HLA-DR y CD33 [2, 17]. A medida que avanza la MCp estos marcadores tempranos van desapareciendo para dar lugar a la síntesis de glicoproteínas (GP) específicas. Las primeras que aparecen son la GP α II_b (CD41) y la β_3 (CD61) también conocidas como IIb y IIIa respectivamente [18]. Estas proteínas se encuentran asociadas de manera no covalente formando una integrina heterodimérica inactiva que se localiza principalmente en la membrana celular formando el complejo GP IIb-IIIa el cual posee gran importancia en la función hemostática de la plaqueta al constituir el receptor de ciertas proteínas adhesivas, como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand, que actúan durante la activación plaquetaria como puente de unión interplaquetario [19]. Más tardíamente, comienza a expresarse otro marcador relevante del linaje megacariocítico, el complejo glicoproteico Ib/IX/V, que juega un papel esencial en la adhesión de las plaquetas al subendotelio [20]. Junto con este complejo, se expresa CD36 que identifica a la GP IV, receptor para trombospondina y el colágeno tipo I [21]. Interesa destacar que todas estas GPs pueden ser endocitadas para formar un reservorio en los gránulos [22-25].

1.2. Estructura del megacariocito

Las características más relevantes de los MCs maduros, además de las mencionadas previamente, son la presencia de gránulos citoplasmáticos de cuatro tipos: los gránulos α , δ o densos, lisosomas y peroxisomas.

Los gránulos α contienen proteínas que juegan un papel importante en la hemostasia, inflamación y reparación de tejidos siendo las únicas específicas de MCs el factor plaquetario 4 y la tromboglobulina (Cuadro 2) [1]. Estos gránulos adquieren sus proteínas a través de dos mecanismos distintos: biosíntesis [26] o endocitosis tanto mediada por receptor o a través de fase fluida [27].

Cuadro 2. Proteínas de los gránulos α .

Proteínas de matriz		Proteínas de membrana
Altas concentraciones plasmáticas	Bajas concentraciones plasmáticas	Sólo en membrana de gránulos α
Endocitadas Fibrinógeno Albúmina Fibronectina IgG, A y M	Multimerina β -Tromboglobulina Factor plaquetario 4 Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	P-selectina GMP-33 Osteonectina
Sintetizadas por MCs factor von Willebrand Trombospondina factor V de coagulación	Factor transformador del crecimiento- β (TGF- β) Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	En membrana plasmática y de gránulos α GP Iib-IIIa GP IV CD9 PECAM GP Ib-IX-V Rap

Los gránulos densos, que aparecen en estadios más maduros de diferenciación que los gránulos α , presentan en su membrana las glicoproteínas IIb-IIIa, Ib, granulofisina y P-selectina [23-25]. En su interior contienen nucleótidos de adenina, cationes divalentes, histamina, serotonina y adrenalina [28]. Todas estas moléculas participan en la formación del trombo plaquetario, ya que al ser liberadas, activan plaquetas generando un mecanismo de retroalimentación positiva.

Si bien los lisosomas comparten con los gránulos densos la expresión de granulofisina (CD63), también contienen enzimas específicas como catepsina D y E, diversas glicosidasas, fosfolipasa A_2 , fosfatasa ácida y aril sulfatasa [29-32]. Los lisosomas también son liberados durante la activación plaquetaria pero no tienen ninguna función hemostática. Al igual que en el resto de las células estos gránulos se encargan del procesamiento y reciclado de las vesículas endocíticas o pinocíticas por hidrólisis [33, 34].

Por último, se cree que los peroxisomas contienen catalasa y peroxidasa de manera tal que pueden metabolizar especies reactivas del oxígeno [35, 36].

1.3. Regulación de la megacariocitopoyesis

Inicialmente se consideraba que el desarrollo de los MCs, al igual que el de otros linajes celulares sanguíneos, requería de dos factores humorales distintos: uno de acción temprana, promotor de la proliferación celular y otro, más tardío, capaz de estimular la maduración. Los primeros hallazgos demostraron que tanto

las interleuquinas (IL)-3, 6 y 11 como el factor de crecimiento de células madres (SCF del inglés *stem cell factor*) eran capaces de estimular los estadios iniciales de la MCp [37]. Sin embargo, no se había logrado la identificación de un factor destinado a la maduración final de estas células.

1.3.1. c-Mpl

El primer paso para el descubrimiento de la trombopoyetina (TPO) y su receptor fue la identificación del virus responsable de la leucemia mieloproliferativa murina denominado MPLV (del inglés *Myeloproliferative Leukemia Virus*) [38]. El oncogen transformante (v-mpl) fue reportado recién en 1990 [39] y gracias a este hallazgo, fue clonado el correspondiente proto-oncogen celular humano (c-Mpl) [40].

El c-Mpl fue posteriormente clasificado dentro de la superfamilia de receptores para factores de crecimiento y, como carece de actividad quinasa intrínseca, a su vez dentro de la subfamilia “tipo I” (junto con los receptores para EPO, G-, GM-CSF y las IL-1 a la 7, entre otras). El gen del c-Mpl humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p34) y está compuesto por 12 exones que codifican para una proteína de 635 AA y 71 kDa. Tanto en humanos como en ratones existen 3 formas diferentes del Mpl generadas por empalmes (*splicing*) alternativos pero sólo una de ellas (denominada Mpl-P) es completamente funcional [41].

1.3.2. Trombopoyetina

Aunque el término trombopoyetina (TPO) fue usado por primera vez en 1958 para describir la sustancia humoral capaz de aumentar la producción de plaquetas luego de una trombocitopenia inducida [42], el gen para la TPO recién pudo ser clonado en 1994. Este factor de crecimiento ha demostrado ser la citoquina más relevante en la diferenciación y maduración de MCs. El gen de la TPO se localiza en el cromosoma 3q26-q28 y codifica para un polipéptido de 353 aminoácidos (AA) que resulta en una GP de 35 kDa de peso molecular (Figura 1). La misma incluye una secuencia secretora de 21 AA y dos dominios, uno amino-terminal de 154 AA que muestra un 23 % de identidad (50 % similitud) con la eritropoyetina (EPO) y un fragmento único carboxi-terminal de 178 AA que está altamente glicosilado [43].

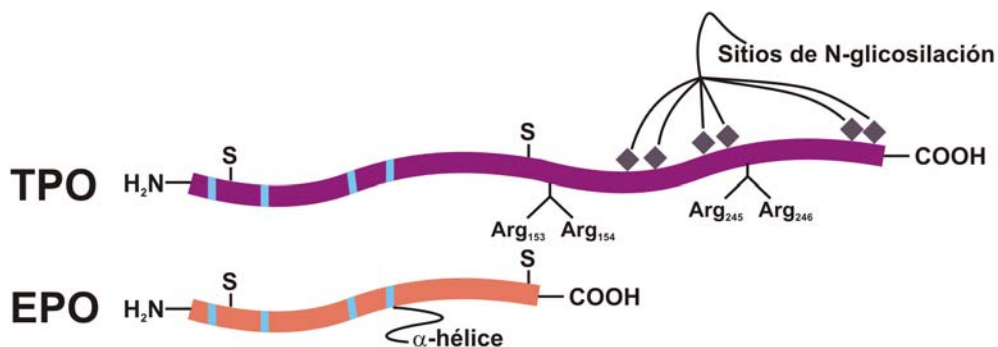


Figura 1. Estructura de la TPO. Comparación con la EPO.

Se ha demostrado que el dominio amino-terminal puede estimular la MCp *in vitro* por sí mismo y que el mismo se encuentra altamente conservado entre

diversas especies, incluyendo humanos, cerdos, ratas, ratones y perros [44]. Además, la primera y última cisteína de este dominio forman dos puentes disulfuro que son fundamentales para la actividad biológica de la TPO. Una forma recombinante de esta citoquina que consiste sólo en este dominio, es totalmente funcional *in vitro*, indicando que el mismo contiene todos los elementos estructurales requeridos para unirse y activar al receptor c-Mpl. En cambio, aún no se ha precisado la función del dominio carboxi-terminal, que contiene abundantes sitios de glicosilación y es rico en prolina, serina y treonina, aunque se especula que podría aumentar la vida media de la TPO [41].

La TPO es producida principalmente en hígado, riñón y en el estroma medular [45, 46]. Tanto *in vivo* como *in vitro* la TPO ejerce los siguientes efectos durante el desarrollo de los MCs:

- Aumenta el número y tamaño de MCs [47].
- Estimula la expresión de GPs plaquetarias específicas [48].
- Estimula la formación de gránulos plaquetarios específicos [49].
- Es el principal estímulo de la endomitosis y poliploidización de MCs [37].
- Promueve el desarrollo del SDM y de campos plaquetarios [49].

Como consecuencia de la eliminación génica de este factor de crecimiento (al igual que la de su receptor) resulta en una severa trombocitopenia presentando una reducción de más del 95 % de los progenitores comisionados al

linaje megacariocítico [50, 51]. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que otras citoquinas como las IL-3, 6, 9, 11, SCF, EPO [37, 52-55] son capaces de sinergizar los efectos de la TPO en los procesos anteriormente enumerados lo cual sugiere que si bien la TPO tiene un papel principal en la MCp, no es la única citoquina involucrada en dicho proceso.

Junto con los efectos descritos en MCs y sus precursores inmediatos, la TPO también permite la supervivencia de *stem cells* [56] y actúa en forma sinérgica con la IL-3 y el SCF para inducir la entrada de estas células al ciclo celular resultando en un aumento de la producción de *stem cells* y progenitoras comisionadas de todos los linajes [57]. De esta manera, los efectos inhibitorios a nivel de todos los estadios de la MCp, la supresión génica de TPO o de su receptor, se asocia con una reducción significativa de los valores normales del número de células progenitoras hematopoyéticas de otros linajes afectando principalmente al eritroide [50].

1.3.3. Mecanismos de señalización que regulan la MCp

Está descrito que la interacción entre la TPO y su receptor promueve la dimerización del c-Mpl. Al igual que otros receptores para citoquinas, la fosforilación de tirosina es esencial para la iniciación de la señal del c-Mpl y los subsecuentes eventos de transducción. A diferencia de aquellos receptores para factores de crecimiento hematopoyéticos que presentan actividad de tirosina-quinasa intrínseca, la fosforilación del c-Mpl es debido a una tirosina-quinasa citoplasmática denominada JAK2 (del inglés *Janus Kinase 2*) que se activa como

consecuencia del cambio en la conformación del c-Mpl luego de su unión con la TPO [58]. La activación de JAK2 promueve la fosforilación de los residuos de tirosina en la porción distal del c-Mpl generando un sitio de reclutamiento de proteínas SH2. La unión de la TPO al c-Mpl gatilla al menos tres eventos de señalización críticos que median los efectos de este factor de crecimiento sobre células hematopoyéticas humanas (Figura 2):

- Fosforilación y activación de un grupo de proteínas denominado STATs (del inglés *Signal Transducers and Activators of Transcription*). Las STATs fosforiladas, dimerizan, translocan al núcleo y estimulan la transcripción génica [59].
- Activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) que activa *Akt* (también llamada PKB), enzima implicada en la proliferación celular. Este mecanismo es potenciado por la fosforilación de SH₂ [60, 61]. Además se activa una PKC que potencia la respuesta proliferativa inducida por *Akt* [62].
- Activación de la quinasa MEK (del inglés *Mitogen-activated protein/ERK Kinase*) la cual fosfolila las MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*) ERK 1/2 (del inglés *Extracellular-signal-Regulated Kinase*). La activación de ERKs promueve la endomitosis de MCs [63]. Además, la activación de PKC ζ contribuye a la activación de estas MAPK [64].

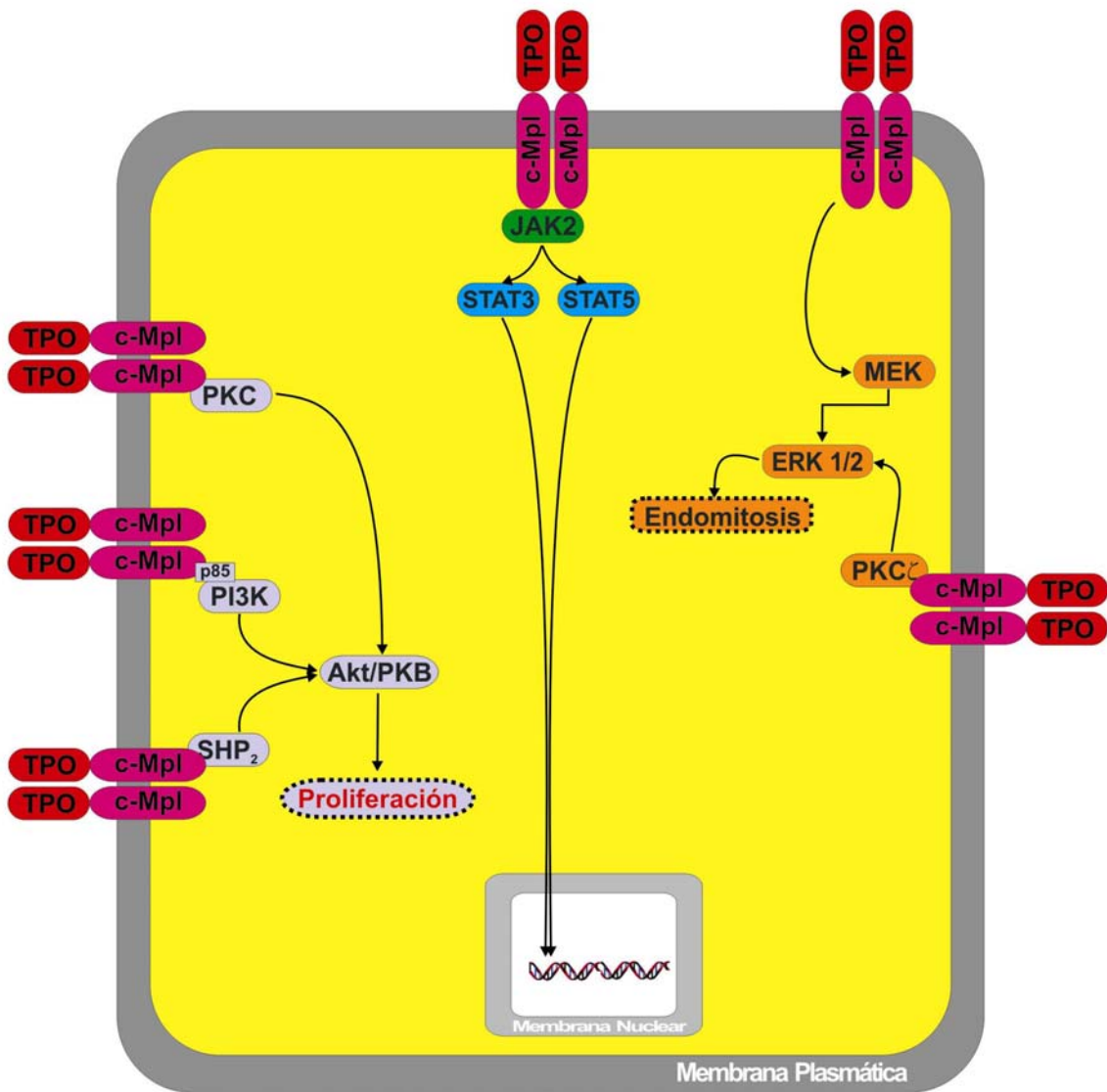


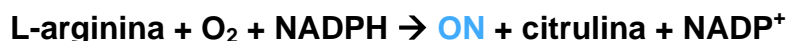
Figura 2. Mecanismos de señalización intracelular mediados por la interacción TPO/c-Mpl en células hematopoyéticas humanas.

1.4. Oxido nítrico

El óxido nítrico (ON) está involucrado en distintos procesos fisiológicos y patológicos. Es una molécula compuesta por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno determinando un número total de 15 electrones. De estos electrones, uno

se encuentra desapareado en el orbital molecular más externo, dándole un carácter de radical libre con una corta vida media en medios biológicos. Dado que es apolar, se particiona bien en medios hidrofóbicos y esto le permite difundir a través de membranas biológicas funcionando como mensajero intercelular. Desde el punto de vista redox, es un agente oxidante débil y algo mejor reductor [65].

Es sintetizado por una familia de enzimas denominadas ON sintetasas (NOS del inglés *Nitric Oxide Synthase*) según la siguiente reacción en la cual el grupo guanidino de la arginina se oxida a ON:



1.4.1. Generación enzimática de ON

La forma activa de las NOS se refiere a dos moléculas de la enzima unidas a otras dos de calmodulina (CaM) conformando un tetrámero. Su acción es dependiente de los siguientes co-factores: (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4), flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y Fe-protoporfirina IX (hemo) (Figura 3). Se han caracterizado tres isoformas distintas, que son producto de genes diferentes con una homología del 51-57 % entre las isoformas humanas y cada una de ellas presenta diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores [66].

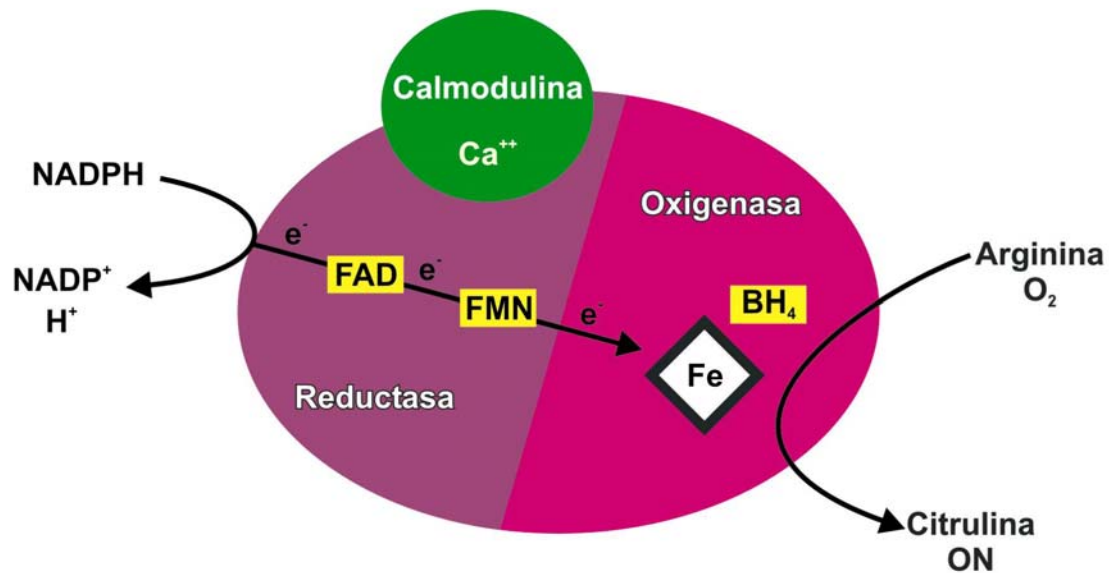


Figura 3. Estructura esquemática de las NOS. Adaptado de Biochem J (2000) 357: 593.

Si bien existe una sola copia de los diferentes genes de cada una de las isoformas de las NOS en el genoma haploide humano, estos poseen una estructura genómica similar lo que sugiere que provienen de un gen ancestral común. Las NOS muestran una estructura en dos dominios (Figura 4) en la cual el dominio amino-terminal (con función oxigenasa) contiene sitios de unión para el grupo hemo, BH₄ y L-arginina que además se une por un sitio de reconocimiento a la CaM al dominio carboxi-terminal (con función reductasa) el cual contiene los sitios de unión para FAD, FMN y NADPH [65].

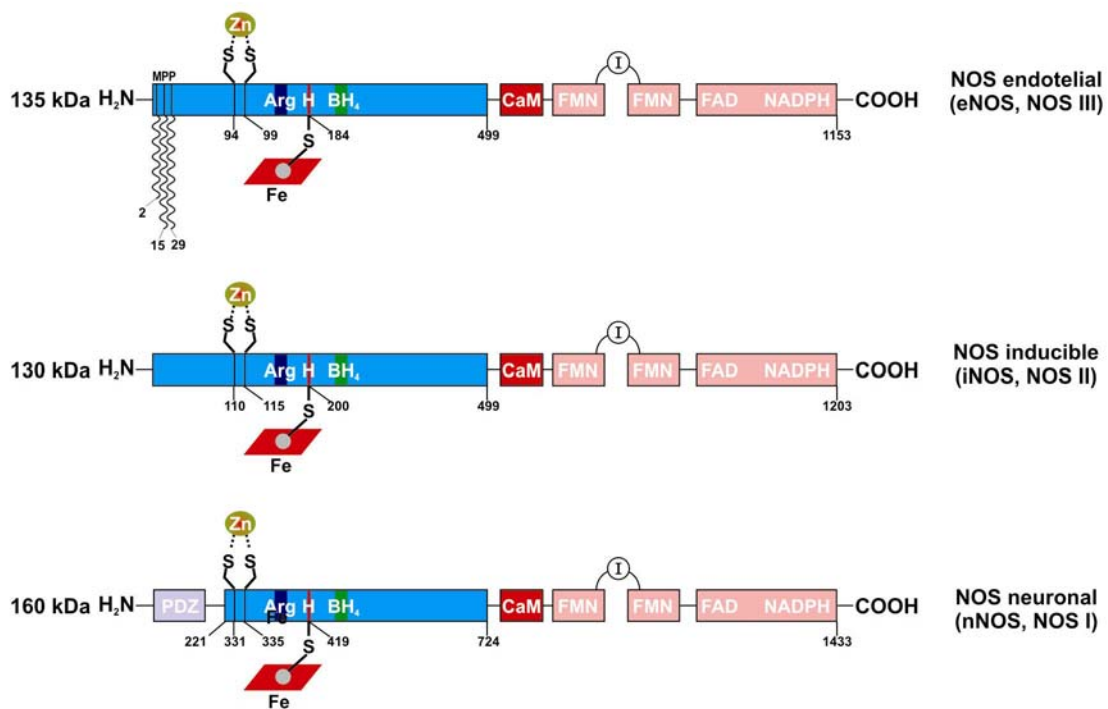


Figura 4. Comparación estructural de las NOS. PDZ: dominio que favorece la localización sináptica.

Las isoformas fueron denominadas según el tejido en el cual fueron identificadas originalmente: la nNOS (también conocida como tipo I) hallada en el tejido neuronal, la iNOS (tipo II) en macrófagos y la eNOS (tipo III) en células endoteliales vasculares. También fueron caracterizadas por su expresión constitutiva (eNOS y nNOS) o inducible (iNOS) y por su dependencia (eNOS/nNOS) o independencia (iNOS) del calcio (Ca^{++}) [65]. Sin embargo, como se explica a continuación, hoy se conoce que tales diferencias no son tan estrictas. Además de estar expresadas en los tejidos anteriormente mencionados, cada una de estas isoformas fueron identificadas posteriormente en otros tejidos

revelando expresión de nNOS en músculo esquelético y epitelio respiratorio [67, 68] y de eNOS en miocardio, músculo esquelético, células epiteliales y neuronas [69-72].

La síntesis de eNOS también puede ser inducida por diferentes estímulos como el VEGF, el entrenamiento físico y los aumentos en las fuerzas de rozamiento (*shear stress*) [73-75]. Recientemente, hemos demostrado un aumento en la expresión de eNOS en células endoteliales infectadas con virus Junin y también se ha descrito este aumento en células endoteliales y de Schwann del nervio sciático durante la neuritis autoinmune experimental [76, 77]. En cuanto a la iNOS, se ha demostrado su expresión constitutiva en linfocitos B transformados con el virus Epstein Barr así como también en ciertos tipos celulares de otras especies como las células de Leydig de rata o del sistema reproductor equino [78-80].

Por otra parte, ha sido reportada la presencia y actividad de “proteínas del tipo NOS” en las mitocondrias (mtNOS) mediante diversas técnicas [81, 82]. Sin embargo, aún se debate acerca de la identidad de la mtNOS ya que existe reacción cruzada de esta enzima con anticuerpos anti-eNOS, nNOS e iNOS [83-85]. Esta enzima se ubicaría principalmente en la membrana mitocondrial interna, próxima a los complejos de la cadena respiratoria y tendría un papel importante en la regulación de la respiración, el potencial de membrana y el pH de la matriz mitocondrial y la disponibilidad de oxígeno y energía en los tejidos [86].

1.4.2. Regulación de la actividad de las NOS

La CaM fue la primer proteína reportada con capacidad de interactuar con las NOS y hoy se acepta que es necesaria para la actividad biológica de las tres isoformas. La CaM se une a la eNOS únicamente cuando los niveles intracelulares de Ca^{++} aumentan como respuesta a señales extracelulares, tales como aumento en las fuerzas de rozamiento de la sangre, o por la acción de la acetilcolina, histamina, serotonina, bradiquinina, o sustancia P [65].

La activación de la eNOS también puede responder a un mecanismo de fosforilación. Un aumento en las fuerzas de rozamiento en la circulación sanguínea promueve la fosforilación de la eNOS a través de la proteína quinasa *Akt* promoviendo un aumento de su actividad [87, 88].

La proteína de choque térmico 90 (Hsp90) ha sido identificada como un modulador alostérico de la eNOS. La activación de células endoteliales por el VEGF, histamina o fuerzas de rozamiento aumentan la interacción de esta chaperona con la eNOS aumentando aproximadamente tres veces la actividad de esta última [89].

Entre las tres isoformas sólo la eNOS sufre dos modificaciones postraduccionales claves para su regulación: es acilada tanto por miristato como por palmitato. Esta doble acilación es requisito para su localización eficiente en las caveolas de las células endoteliales [90].

La iNOS se fija irreversiblemente a la CaM de manera que no depende de la concentración de Ca^{++} . A diferencia de las otras dos isoformas, la iNOS carece

de una secuencia de 40-50 AA en el centro del subdominio de unión al FMN que forma un *loop* que permite autoinhibir la enzima desestabilizando la unión de CaM en bajas concentraciones de Ca^{++} e inhibiendo la transferencia de electrones desde el FMN hacia el hemo en ausencia de $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ [91]. En forma similar a la eNOS, la iNOS es regulada por la interacción con proteínas ya que se ha demostrado que una proteína citosólica denominada kalirina inhibe su actividad catalítica impidiendo la formación de homodímeros de esta isoforma de NOS [92].

1.4.3. Inhibidores de las NOS

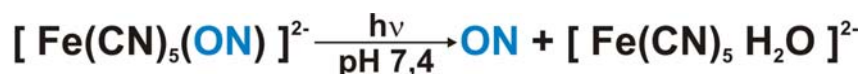
Existen numerosos inhibidores de las tres isoenzimas que presentan diferencias en su especificidad, sitio de interacción y modo de acción. En el presente trabajo de Tesis se utilizaron dos inhibidores que son análogos de la L-arginina: la N^{G} -Monometil-L-arginina (L-NMMA) que es un inhibidor no selectivo y la N^{G} -Nitro-L-arginina-Metil Ester (L-NAME) que es parcialmente selectivo para la eNOS [65].

1.4.4. Generación no enzimática de ON

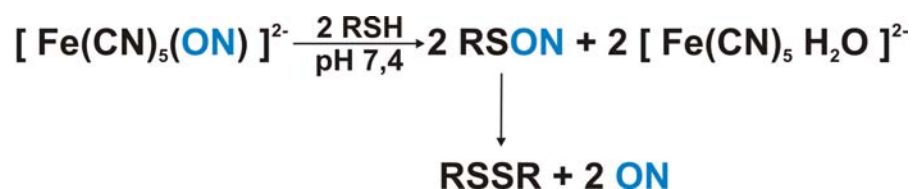
El ON también puede ser generado de manera no enzimática a partir de algunas moléculas como son los S-nitrosotioles, nitratos orgánicos, complejos hierro-nitrosilo y los complejos iónicos de aminas secundarias con ON [65].

En el presente trabajo de Tesis utilizamos dos tipos de dadores de ON: uno de ellos fue el nitroprusiato de sodio (NPS) que pertenece al grupo de complejos

hierro-nitrosilo. Este compuesto puede descomponerse en ON por efecto de la luz:

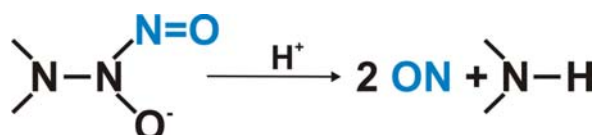


Sin embargo, el NPS no libera ON espontáneamente *in vitro* sino que requiere una reducción parcial. Por ejemplo, los tioles pueden funcionar como agentes reductores:

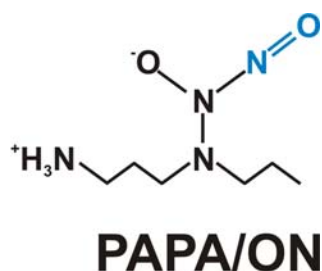
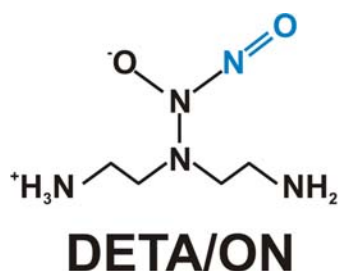


El NPS es utilizado clínicamente como vasodilatador en el tratamiento de las crisis hipertensivas [93] aunque sólo puede administrarse a pacientes con función renal y hepática normales debido a su toxicidad [94].

Los otros dadores utilizados pertenecen al grupo de compuestos denominados NONOatos de aminas que presentan fórmula general $\text{R}_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$. Estos compuestos estabilizan el ON durante su almacenamiento como sólidos, son altamente solubles en agua y pueden liberar ON con una cinética que puede ser ajustada dentro de amplios rangos dependiendo del nucleófilo transportador (R_2NH) [95, 96]. Liberan ON espontáneamente de manera dependiente del pH, no requieren reacciones redox ni se descomponen por efecto de la luz:



En el presente trabajo de Tesis se utilizaron dos representantes de este grupo de compuestos: el 2,2'-(Hidroxinitrosohidracino)*bis*-etanamina (DETA/ON) que posee una vida media de 20 horas a pH 7,4 y el 1-propil-1'-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-nitrosohidrazina (PAPA/ON) cuya vida media es de 15 minutos.



1.4.5. El ON como mediador biológico

1.4.5.1. Modulación del tono vascular

Los primeros estudios acerca de los efectos del ON sobre el tono vascular fueron realizados hace más de dos décadas [97, 98]. La producción endotelial de ON en bajos niveles, asociados a la actividad de la eNOS, provoca la relajación de las VSMC (del inglés *Vascular Smooth Muscle Cells*) y la consecuente vasodilatación. Esta liberación constante de pequeñas cantidades de ON es crítica para el mantenimiento del tono vascular basal ya que su inhibición, tanto farmacológica como por disrupción génica dirigida, provoca un aumento en la presión arterial [99]. Además, los pacientes con hipertensión esencial presentan una menor producción de ON [100]. En cambio, niveles elevados de ON, como los que se encuentran en choque séptico, conducen hacia una respuesta vasodilatadora exacerbada e hipotensión [101].

El ON producido en el citosol de células endoteliales difunde hacia las VSMC y se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs). La activación de la GCs provoca un aumento en los niveles citosólicos de GMPc y una disminución del flujo de Ca^{++} intracelular [102]. Esto último causa una disminución en la formación del complejo Ca^{++} /CaM quinasa de la cadena liviana de miosina en las VSMC promoviendo la vasorrelajación por la alteración en la fosforilación de las cadenas livianas de la miosina [103]. El GMPc disminuye el flujo de Ca^{++} intracelular porque inhibe directamente los canales de Ca^{++} dependientes del voltaje [104] y activa proteína-quinasa, primordialmente la PKG I (Figura 5) [105]. La PKG I fosforila proteínas en el retículo sarcoplásmico, incluyendo los canales de potasio dependientes de Ca^{++} [104], el sustrato de la quinasa dependiente de GMPc asociado a 1,4,5 inositol trifosfato (IRAG) [106] y la proteína *phospholamban* la cual activa la ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) [107]. La fosforilación de estas proteínas conduce al secuestro de Ca^{++} en el retículo sarcoplásmico resultando en un menor flujo del mismo. Es importante destacar que el ON puede también activar directamente los canales de potasio en VSMC. Este mecanismo independiente de GMPc también resulta en un menor flujo de Ca^{++} y promueve la vasodilatación a través de la alteración de la fosforilación de las cadenas livianas de miosina [104].

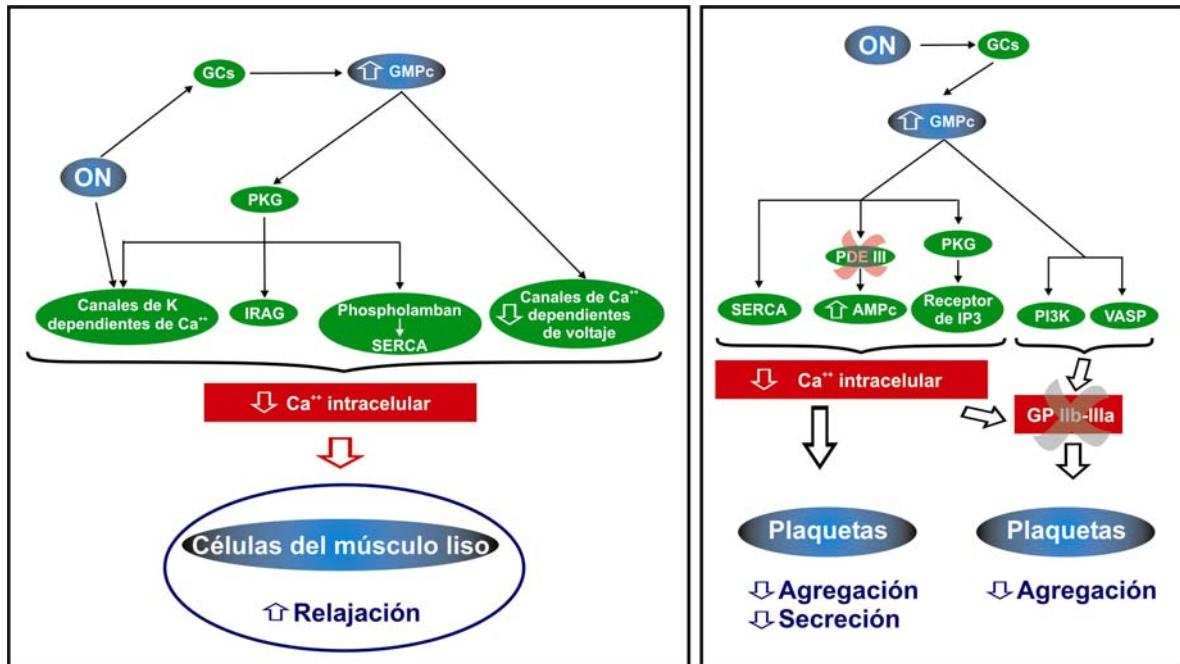


Figura 5. Mecanismos de regulación del tono vascular y de inhibición de la función plaquetaria gatillados por ON.

1.4.5.2. Inhibición de la adhesión, agregación y reclutamiento de plaquetas

El ON producido a través de la eNOS por el endotelio o por las plaquetas inhibe la adhesión, agregación y reclutamiento de plaquetas hacia el trombo [108]. Mientras que la capacidad de las plaquetas de formar el tapón hemostático es crítica para la reparación de heridas, la hiperactividad plaquetaria se asocia con el desarrollo de trombosis arterial e infarto cerebral [109]. La inhibición de la generación enzimática de ON acorta el tiempo normal de sangría y produce acumulación de plaquetas en la vasculatura [110].

En cuanto a la iNOS, posee un rol protector clave en la reparación vascular luego de la injuria. En esta situación, la exposición de estructuras subendoteliales

permite el reclutamiento y activación de plaquetas circulantes. Este proceso debe ser controlado ya que el crecimiento desmedido del trombo puede generar una oclusión del vaso y esto es regulado por el ON generado por las células del músculo liso, las cuales presentan una expresión aumentada de iNOS [111].

Al igual que en la vasorrelajación, el ON ejerce sus efectos inhibitorios sobre plaquetas a través del GMPc. El ON derivado del endotelio difunde hasta el espacio intracelular de las plaquetas y se une a la GCs causando un aumento del GMPc y una disminución del flujo de Ca^{++} intracelular [112, 113]. Esta disminución puede inhibir el cambio hacia la conformación activa de la GP IIb-IIIa impidiendo la asociación entre las plaquetas y el fibrinógeno [114, 115]. La disminución del flujo de Ca^{++} intracelular dependiente de GMPc observada en plaquetas se asocia con la activación de SERCA pero de manera independiente de la fosforilación de *thrombolamban* (descrita como una proteína tipo *phospholamban* en plaquetas) [116, 117].

Además, el GMPc posee otros tres mecanismos que suprimen la función plaquetaria. Uno de ellos es la inhibición de la activación de la PI3K mediada por trombina [118]. Dado que la activación de esta quinasa promueve el cambio de conformación de la GP IIb-IIIa hacia su forma activa, su inhibición disminuye la asociación irreversible del fibrinógeno con dicha GP e impide la unión plaqueta/plaqueta. El segundo mecanismo ocurre a través de un aumento indirecto del AMPc intracelular que resulta de la inhibición de la degradación de este nucleótido cíclico por activación de la fosfodiesterasa III (PDE III) mediada por el ON [119]. El aumento de AMPc promueve la disminución del flujo de Ca^{++}

intracelular [120, 121]. El último mecanismo es la fosforilación de VASP (del inglés *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) que es un componente regulatorio esencial para la inhibición de la activación de plaquetas ya que inhibe la unión de la GP IIb-IIIa al fibrinógeno y la expresión de P-selectina [122-124].

1.4.5.3. Regulación de la hematopoyesis por ON

Varios estudios han demostrado la participación del ON en la regulación de la hematopoyesis. Sin embargo, su papel en el crecimiento celular aún no ha sido definido con precisión ya que los resultados obtenidos presentan controversias [125].

El ON afecta directa y negativamente la hematopoyesis [126, 127]. Los efectos son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición y comprenden desde una inhibición parcial de la proliferación celular hasta la inducción de apoptosis. Tanto las células indiferenciadas como los progenitores eritroides y mieloides tempranos o tardíos son sensibles a los efectos antiproliferativos del ON aunque la sensibilidad difiere entre cada linaje [128].

Una vez generado, el ON puede actuar de manera parácrina o autócrina. Por ejemplo, en el ambiente medular el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1, lipopolisacáridos (LPS) e interferón- γ (IFN- γ) aumentan la expresión de la iNOS en fagocitos mononucleares y osteoclastos [129, 130] y se presume que otras células accesorias, como las endoteliales o los fibroblastos, pueden liberar ON [125]. Este aumento en los niveles de ON inducidos por citoquinas afecta de manera

parácrina el crecimiento y diferenciación de células de la médula ósea tanto humana como murina [126, 131] y causan la muerte de diversos tipos de células leucémicas *in vitro* [132].

Por otra parte, también ha sido descrita la expresión de iNOS a nivel del ARNm y de la proteína en precursores hematopoyéticos indiferenciados [126]. El ON producido por la estimulación de estas células con citoquinas podría funcionar de manera autócrina como otro mecanismo de regulación negativa de la hematopoyesis [127, 133].

En la hematopoyesis han sido demostrados efectos bifásicos del ON utilizando como modelo la inhibición de la hematopoyesis por el uso de anticuerpos anti-HLA-DR. La muerte celular programada gatillada por estos anticuerpos es mediada por ON. Mientras que altas concentraciones de dadores de ON reproducen el efecto proapoptótico de los anticuerpos anti-HLA-DR, el uso del mismo dador de ON en bajas concentraciones protege la formación de colonias. Esta respuesta dual de la hematopoyesis frente a dadores de ON sugiere una compleja red reguladora posiblemente relacionada con diferencias en la sensibilidad al ON de cada subpoblación celular [134].

Un aspecto novedoso de regulación de la hematopoyesis mediada por ON a ha sido descrito recientemente por Michurina y col. quienes demostraron que este compuesto puede formar parte del control homeostático del reservorio medular de precursores hematopoyéticos indiferenciados [135]. En su trabajo, los autores muestran que la inhibición farmacológica de las NOS *in vivo* da como resultado un aumento de precursores hematopoyéticos indiferenciados y de

progenitores tempranos residentes en la médula ósea sugiriendo que el ON permitiría mantener un tono antiproliferativo dominante en células indiferenciadas contribuyendo así a la quiescencia de las mismas. Hasta el inicio de este trabajo de Tesis no se conocían reportes sobre el papel del ON en la MCP.

1.4.5.4. Regulación de otros sistemas

El ON también juega un papel importante como mensajero inter e intracelular actuando en el sistema nervioso [136], orquestando la respiración celular a nivel mitocondrial [137] y siendo uno de los componentes de la respuesta inmune [138].

1.5. Muerte celular programada o apoptosis

1.5.1. Consideraciones generales

Si bien ya en 1842, en base a los trabajos realizados por Carl Vogt sobre la metamorfosis de anfibios, la muerte celular comenzó a considerarse como un fenómeno fisiológico importante, no fue hasta 1964 que el concepto de "muerte celular programada" fue utilizado por primera vez para describir la muerte de las células que ocurría en lugares y momentos determinados como eventos programados dentro del plan de desarrollo del organismo [139]. Años después, en 1972, Kerr, Wyllie y Currie a partir de una recopilación de evidencias morfológicas, establecen las diferencias entre dos tipos de muerte celular, una patológica y otra fisiológica [140].

La primera, denominada necrosis, resulta de la exposición celular a procesos de injuria severos tales como aquellos inducidos por isquemia, hipertemia sostenida o exposición a sustancias químicas. Es referida también como muerte accidental y se asocia generalmente a la existencia de extensos procesos de daño tisular. Si bien no resulta sencillo establecer un patrón común de cambios en la célula necrótica, la membrana plasmática constituye el sitio crítico donde se produce la injuria temprana, merced a la cual la célula pierde, en forma irreversible, la capacidad de regular su medio interno. El proceso necrótico involucra la lisis celular con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular, hecho que estimula una respuesta inflamatoria [141]. La muerte fisiológica ocurre durante el desarrollo o la homeostasis del organismo en la cual se mantiene la integridad de la célula y que, en referencia a la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor, Kerr y col. denominaron apoptosis [140]. La muerte por apoptosis responde a un programa de muerte intracelular que puede ser activado o inhibido por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como patológicos.

En 1986, Ellis y Horvitz publicaron los estudios realizados sobre el nematode *Caenorhabditis elegans* describiendo los genes encargados del control y la ejecución de la apoptosis [142]. Gracias a la homología existente entre estos genes de *C. elegans* y los de organismos superiores, estos estudios han permitido identificar una parte importante de la red de mecanismos que controlan la muerte en estos últimos.

La muerte celular programada es un mecanismo básico implicado en numerosos procesos:

- Desarrollo embrionario.
- Escultura de numerosas estructuras.
- Eliminación de estructuras.
- Control de la sobreproducción de células.
- Control de células defectuosas.
- Formación de células diferenciales especiales.
- Mecanismos selectivos.
- Homeostasis.

1.5.2. Alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas

Durante el desarrollo del proceso apoptótico se ponen de manifiesto un conjunto de alteraciones morfológicas semejantes en diversos tipos celulares. Desde las etapas más tempranas se observa una disminución en el tamaño de la célula asociado a la pérdida de agua intracelular [143]. Si bien existen trabajos que reportan una disminución en el flujo acuoso, el/los mecanismo/s responsables de este proceso no han sido dilucidados, aunque se sabe que los mismos no conducen a alteraciones en la presión osmótica de los compartimentos intracelulares [144]. Este proceso de condensación celular determina que las diferentes organelas se encuentren agrupadas al estudiarlas por microscopía

electrónica pero manteniendo su morfología individual inalterada [140].

El colapso nuclear constituye un fenómeno crítico en el proceso apoptótico, observándose una marcada condensación de la cromatina, que comienza formando zonas en asociación con la membrana nuclear y termina dando lugar a una o varias esferas densas en las últimas etapas [145].

Respecto a la membrana citoplasmática, se observan profundos pliegues y arrugas, generadas a través de un proceso denominado *zeiosis* [145]. Es importante destacar, no obstante, que la membrana no muestra pérdida de integridad o alteraciones significativas en su permeabilidad, pero si pierde la asimetría de los fosfolípidos que la componen dejando expuesta la fosfatidilserina, lo que constituye uno de los eventos más precoces de la apoptosis. El reconocimiento de la célula apoptótica depende principalmente de la externalización de la fosfatidilserina [146, 147].

Por último, suele observarse en etapas tardías la fragmentación del ADN, que resulta del clivaje del ADN entre nucleosomas [148].

El destino final de la célula apoptótica es ser endocitada por fagocitos profesionales u otros tipos celulares, tales como fibroblastos y células epiteliales, a través de un proceso que no promueve la liberación de mediadores inflamatorios [149].

1.5.3. Caspasas

La mayoría de las alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas son causadas por una familia de proteasas denominadas “caspasas” por ser **Cisteíno-proteASAS** que hidrolizan a sustratos en sitios reconocidos por la presencia de un residuo **ASP**ártico. Las caspasas son enzimas sumamente conservadas a lo largo de la evolución de las especies. En humanos han sido descritas 14 enzimas diferentes, 8 de las cuales han demostrado participar en el proceso de apoptosis. Las caspasas presentan 3 dominios y son capaces de clivar uniones de tipo Asp-**Xxxx** (uniones posteriores al aspártico). La especificidad de sustrato está determinada por los 4 aminoácidos en posición amino terminal, respecto del sitio de clivaje. Estas cisteíno-proteasas se subdividen en familias, dependiendo de patrones de especificidad, identidad en su secuencia aminoacídica y similitud estructural. Existe un amplio consenso en considerar a las caspasas como ejecutoras del proceso apoptótico [149, 150].

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas no activas denominadas procaspasas. Su activación puede involucrar tres grandes mecanismos (Figura 6) [149, 151]:

- a) Clivaje proteolítico, el cual está mediado por otras caspasas. Este mecanismo de activación prevalece en las caspasas-3, 6 y 7, y también es utilizado por otras proteasas no caspasas como la granzima B.
- b) El reclutamiento o agregación de múltiples procaspasas dentro de un área muy estrecha, resultando en la activación cruzada de las mismas a través de un mecanismo autocatalítico (caspasa-8).

- c) La asociación con un cofactor (formación de holoenzima), mecanismo que explicaría la activación de la caspasa-9 merced a su unión al cofactor Apaf-1. El complejo caspasa-9/Apaf-1 constituiría, en realidad, la forma activa de caspasa-9.

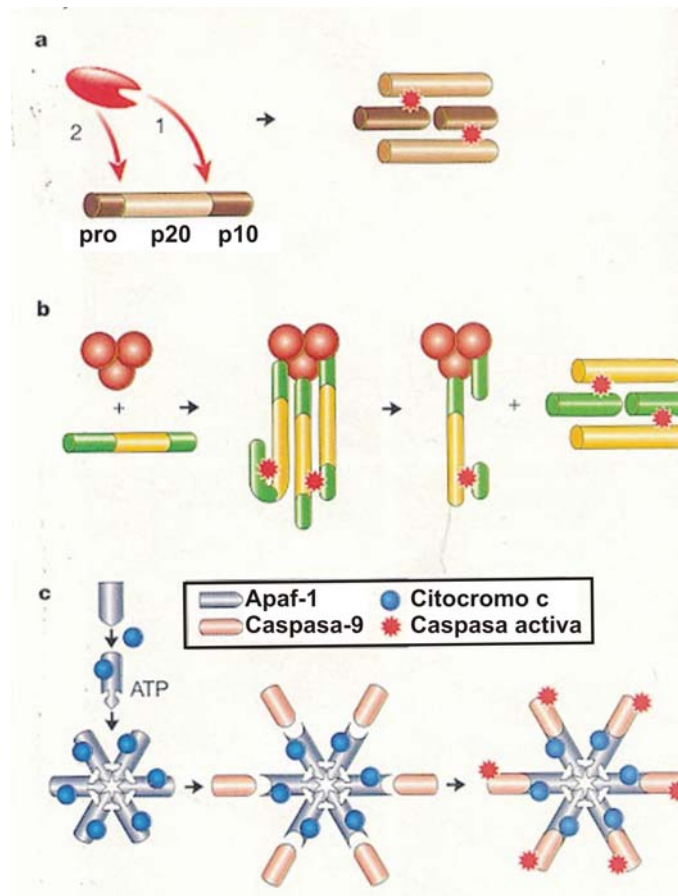


Figura 6. Mecanismo de activación de caspasas. a) clivaje proteolítico, b) clivaje autocatalítico, c) formación de holoenzima. *Adaptado de Nature (2000) 407:770.*

La activación de caspasas iniciadoras (procaspasas-8, 9 y 10) conduce a la proteólisis de caspasas efectoras (procaspasas-3, 6, 7), proceso que culmina en la degradación de un grupo específico de proteínas, integrado al menos por 100

moléculas diferentes. En la mayoría de los casos, la acción de las caspasas se traduce en la inactivación de la proteína blanco, como sucede en el clivaje de proteínas del citoesqueleto (citoqueratina, actina, gelsolina, entre otras). No obstante, para algunos sustratos de las caspasas, el ataque proteolítico resulta en la adquisición de una actividad enzimática [149]. Tal es el caso de la DNAsa responsable de clivar el ADN entre los nucleosomas, cuya evidencia (detección del *ladder*) denota la existencia de un proceso apoptótico [152]. La enzima responsable de este proceso, denominada CAD (DNAsa activada por caspasa), se presenta en forma de un complejo inactivo, asociado a una subunidad inhibitoria denominada ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasas). La activación de CAD ocurre a través de caspasa-3, la cual media el clivaje de la subunidad inhibitoria y la liberación y activación de la subunidad catalítica [153, 154]. Además, las caspasas pueden clivar PAK2, un miembro de las familias de quinasas que activa p21, lo que promueve el fenómeno de *blebbing* (burbujeo), observado en las células apoptóticas [155].

Es importante destacar que no todas las caspasas funcionan exclusivamente como promotoras del proceso apoptótico. Algunas tienen función proinflamatoria, como es el caso de la caspasa 1 o ICE (enzima convertidora de IL-1 β). La IL-1 β es inicialmente sintetizada como un precursor inactivo (pro IL-1 β), que carece de péptido señal. La caspasa-1 cliva este precursor produciendo la forma madura (activa) de la IL-1 β la cual es secretada al compartimiento extracelular [156].

1.5.4. Vías de activación del proceso apoptótico

Han sido caracterizadas dos vías principales que conducen al desarrollo del proceso apoptótico. La vía extrínseca es iniciada por receptores transmembrana que expresan un dominio de muerte celular (FAS, receptores de TNF- α y receptores TRAIL (del inglés, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) y conduce a la activación de las caspasas-8 y 10 a través de la interacción de proteínas adaptadoras tales como FADD o TRADD con los dominios de muerte de los receptores FAS o TNF- α , respectivamente dando como resultado el clivaje de las caspasas-3, 6 y 7. La vía intrínseca (también conocida como vía mitocondrial) involucra la inducción de alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales como Smac/Diablo (por *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with a low isoelectric point*), HtrA2, citocromo c y AIF (por *apoptosis inducing factor*) [149]. El citocromo c, en forma conjunta con Apaf-1, y procaspasa-9 generan la forma activa de esta caspasa, que en presencia de ATP forma el apoptosoma, iniciando la cascada de activación de caspasas, mientras que Smac/Diablo y HtrA2 antagonizan a las moléculas antiapoptóticas IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) [157]. La vía intrínseca puede ser activada entre otros por oncoproteínas, daño directo al ADN, hipoxia y privación de factores de crecimiento [149] (Figura 7).

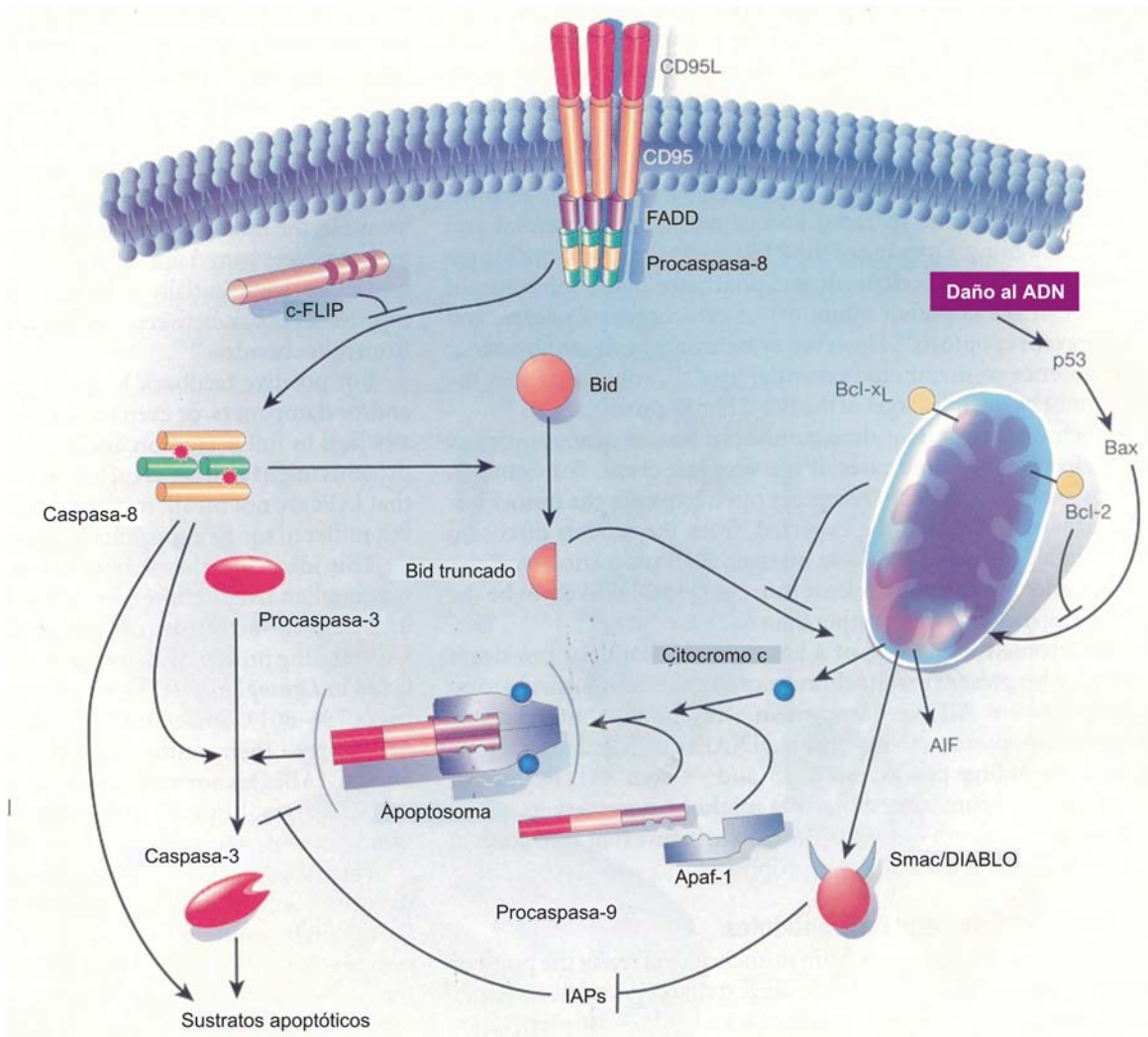


Figura 7. Descripción de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Adaptado de Nature (2000) 407:770.

1.5.5. Proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2

La permeabilidad de la membrana mitocondrial es regulada por miembros de la familia Bcl-2. Esta familia ha sido dividida en tres grupos, considerando aspectos relativos a su similitud estructural y funcional. Los miembros del grupo I poseen actividad antiapoptótica (Bcl-2, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-xL), mientras que los

del grupo II y III promueven la muerte celular (Bax, Bak, Bok, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik/Nbk, Blk, Hrk, Bim/Bod, Nip3, Nix/Bnip3). Pueden formar homodímeros pero, notablemente, miembros de esta familia con actividad pro y antiapoptótica pueden formar heterodímeros. Dado que cada uno de ellos puede interactuar con muchos de los otros miembros de la familia, es usual que se establezca un gran número de heterodímeros diferentes. La dimerización de miembros con actividades pro y antiapoptótica conduce a la neutralización de ambas actividades. Por lo tanto, un aspecto crítico en cuanto al resultado final que impone la familia Bcl-2 sobre el proceso de apoptosis (prevención vs. promoción) está dado por el balance entre elementos pro y antiapoptóticos pertenecientes a esta familia [158].

Los miembros de la familia Bcl-2 participan en la liberación de los factores proapoptóticos del compartimiento intermembrana mitocondrial hacia el citosol, principalmente de citocromo c por un mecanismo aún controvertido. Se ha propuesto que los miembros de la familia Bcl-2 forman canales o poros transmembrana, o que los mismos puedan ocasionar la ruptura de la membrana externa de la mitocondria facilitando la liberación de proteínas mitocondriales. Se ha especulado también, que proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 puedan interaccionar con la proteína de canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la cual forma canales transmembrana de pequeño calibre que serían amplificados por miembros de la familia Bcl-2 [158].

Finalmente es importante aclarar que han sido demostrados caminos interactivos que vinculan la vía extrínseca e intrínseca de activación de la apoptosis. Así, la caspasa-8 es capaz de inducir la activación de Bid, facilitando

de este modo la liberación de citocromo c y produciendo una amplificación de las señales apoptóticas [159].

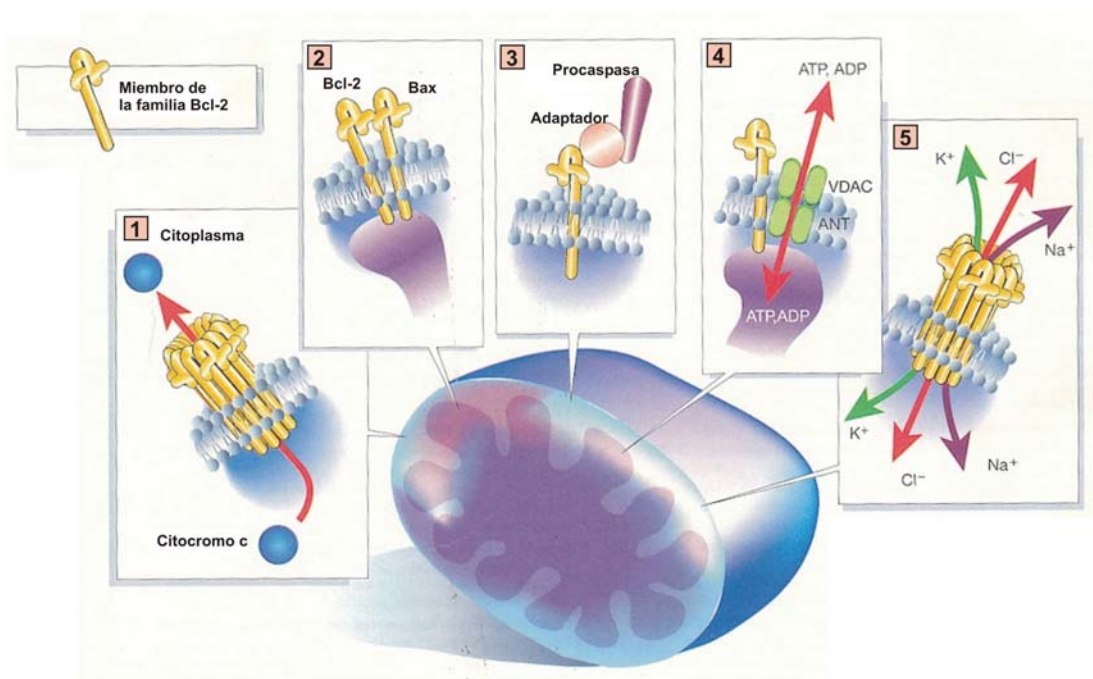


Figura 8. Mecanismos de acción de los miembros de la familia Bcl-2. De izquierda a derecha: 1) Formación de un poro que permite la liberación de citocromo c. 2) Heterodimerización. 3) Regulación directa de caspasas a través de moléculas adaptadoras. 4) Interacción con otras proteínas de la mitocondria modulando la homeostasis mitocondrial. 5) Oligomerización para formar canales iónicos débilmente selectivos. *Adaptado de Nature (2000) 407:770.*

1.5.6. Señales de supervivencia

Existen diversas familias de factores de crecimiento que gatillan señales de supervivencia. La unión de estas moléculas con sus receptores se pueden transducir por dos vías principales:

- Activación de la PI3K, con la consecuente fosforilación de la PKB ó Akt, quinasa responsable de la inhibición de la proapoptótica Bad [160].
- Activación de MAPK que, al igual que Akt, promueve la fosforilación de Bad pero a través de la fosforilación de Rsk (a través del mecanismo descrito anteriormente) [161].

Por otra parte, ambos mecanismos promueven la activación de CREB el cual regula positivamente la expresión de genes que permiten la supervivencia celular [162, 163].

OBJETIVOS GENERALES

Estudios *in vitro* han demostrado que cada uno de los distintos pasos de la megacariocitopoyesis (MCp) se encuentra regulado por factores de crecimiento y por interacciones celulares mediadas por diversas moléculas de adhesión [164-166]. Si bien la trombopoyetina (TPO) ha demostrado ser el factor de crecimiento esencial tanto para la proliferación de células progenitoras como para la maduración de los megacariocitos (MCs), otras citoquinas participan como reguladores positivos y negativos de la MCp [54, 167-169]. La participación de segundos mensajeros como el GMPc en la regulación de la MCp mediada por estos factores mitogénicos es muy poco conocida.

El óxido nítrico (ON) es producido por diversos tipos celulares y los efectos biológicos del mismo están generalmente asociados al aumento del GMPc luego de la activación de la guanilato ciclasa [102]. Se ha demostrado que las células de médula ósea sintetizan ON. Sin embargo, hasta el momento, el rol de este radical libre en la MCp es desconocido.

El objetivo de la presente Tesis fue evaluar el efecto del ON en la producción y supervivencia de MCs en cultivo así como también su participación en la producción de plaquetas y en la interacción de MCs con el endotelio vascular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del ON exógeno o endógeno sobre el crecimiento de MCs derivados de células mononucleares y células CD34⁺.
- Examinar el efecto del agregado de DETA/ON en diferentes tiempos luego de la estimulación con TPO.
- Establecer si el DETA/ON induce la muerte celular programada de células CD34⁺ y/o MCs.
- Analizar el mecanismo de apoptosis gatillado por ON estudiando el rol del GMPC, la activación de caspasa-3 y la expresión de Bcl-xL.
- Evaluar si la TPO previene la apoptosis de MCs inducida por ON.
- Estudiar los efectos del ON en otras etapas de la MCp como son la formación de proplaquetas y plaquetas en cultivo y la adhesión de MCs a células endoteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MEDULA OSEA

3.1.1. Aislamiento de células mononucleares (CMN)

Las muestras de médula ósea provenientes de pacientes hematológicamente normales sometidos a cirugía de reemplazo de cadera, se recogieron en tubos conteniendo medio de cultivo *Iscove's Modified Dulbecco Medium* (IMDM), penicilina-estreptomicina (PS, 100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente, Invitrogen Life Technologies, Buenos Aires, Argentina), heparina (50 U/ml), EDTA (1 mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y DNAsa (0,1 mg/ml, Roche, Buenos Aires, Argentina). La extracción de CMN se efectuó siguiendo el protocolo de Schattner y col. [54] con algunas modificaciones. Para liberar las células de los fragmentos óseos, se incubaron las muestras con DNAsa fresca durante 15 minutos. Los agregados celulares se dispersaron por homogenización de la muestra a través de una jeringa y aguja y las CMN se aislaron utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma). Luego de dos lavados (10 minutos, 500 g, 4°C) los glóbulos rojos residuales se lisaron con NH₄Cl y las células remanentes se recuperaron por centrifugación en tampón fosfato salino (PBS) conteniendo un colchón de 10 % albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) para eliminar plaquetas y restos celulares.

3.1.2. Purificación de células CD34[±]

La purificación de células CD34[±] se realizó utilizando la técnica de inmunoselección magnética positiva empleando un kit comercial (Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Alemania). Una vez obtenidas, las CMN se incubaron durante 15 minutos con IgG humana y con un anticuerpo monoclonal (AcMo.) anti-CD34 conjugado con un hapteno. Luego de un lavado en PBS suplementado con EDTA (2 mM) y BSA 0,1 % (PBS/EDTA/BSA), las células se incubaron con microesferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo (Ac.) anti-hapteno y tras eliminar el exceso de Ac., las células se resuspendieron en PBS/EDTA/BSA degaseado. Luego de sembrar las muestras en una columna, las células CD34⁺ se obtuvieron por selección magnética positiva. Para aumentar el grado de pureza, el pasaje de las células a través de la columna se realizó dos veces.

3.1.3. Expansión de megacariocitos (MCs)

Los MCs fueron expandidos a partir de CMN o de células CD34⁺.

Las CMN se resuspendieron en IMDM suplementado con trombopoyetina (TPO) humana recombinante (rh) (10-25 ng/ml) (R&D systems, MN, USA y Peprotech, DF, Mexico), suero humano normal (5 %) (preparado a partir de plasma pobre en plaquetas recalcificado), aminoácidos (AA) no esenciales (0,1 mM), y PS (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) (medio completo) en una concentración de $7,5 \times 10^5$ células/ml. En algunos experimentos se utilizó interleuquina-3 (IL-3, Sigma) (10 ng/ml) en lugar de TPO.

Las células CD34⁺ obtenidas luego de la purificación se resuspendieron en medio completo en una concentración de 1×10^5 células/ml. A los 11-13 días de iniciados los cultivos se determinó el número absoluto de MCs en cada muestra

estableciendo:

- Número de células totales por conteo en cámara de Neubauer.
- Porcentaje de MCs determinando a través de citometría de flujo la frecuencia relativa de células CD41⁺ (ver página 64).
- Viabilidad celular por exclusión de azul de trypan.

3.2. CORDON UMBILICAL HUMANO

3.2.1. Aislamiento de CMN

Las muestras de sangre fueron recolectadas inmediatamente luego de partos normales o cesareas en frascos estériles conteniendo EDTA (5 mM). Cada muestra se diluyó con PBS (1:2 v/v) y se centrifugó 15 minutos a 180 g. Luego de descartar el plasma rico en plaquetas, se recompuso el volumen inicial con PBS y se aislaron las CMN utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque. El resto del procedimiento fue similar al descrito para médula ósea.

3.2.2. Purificación de células CD34[±]

La purificación de células CD34[±] se realizó de la misma manera a la descrita en células de médula ósea.

3.2.3. Expansión de MCs

Las células CD34⁺ se resuspendieron en medio completo en una concentración de 1×10^5 células/ml. El día 6 se agregó TPO fresca y en aquellos casos que el recuento fue mayor de 1×10^6 células/ml los cultivos se desdoblaron en partes iguales. Cuatro-seis días después, los cultivos mostraron:

- Disminución en la expresión de CD34 (Figura 9).
- Aumento en la expresión de CD41 por célula (Figuras 9 y 10).
- Aumento en la media del tamaño celular (Figura 10).
- Al menos un 75 % de células CD41⁺ (Figura 10).
- Expresión de CD42b (72 ± 5 % de la población megacariocítica, determinada por citometría de flujo de 2 colores, n=5).
- Expresión de P-selectina y liberación estimulada por α -trombina de Factor von Willebrand (datos no mostrados).
- Presencia de MCs formadores de proplaquetas (figura 11).

Los MCs derivados de médula ósea presentaron características similares a aquellos derivados de cordón umbilical excepto en la ploidía ya que acorde a lo descrito en la literatura, los MCs de médula ósea alcanzaron un mayor nivel de poliploidización (datos no mostrados).

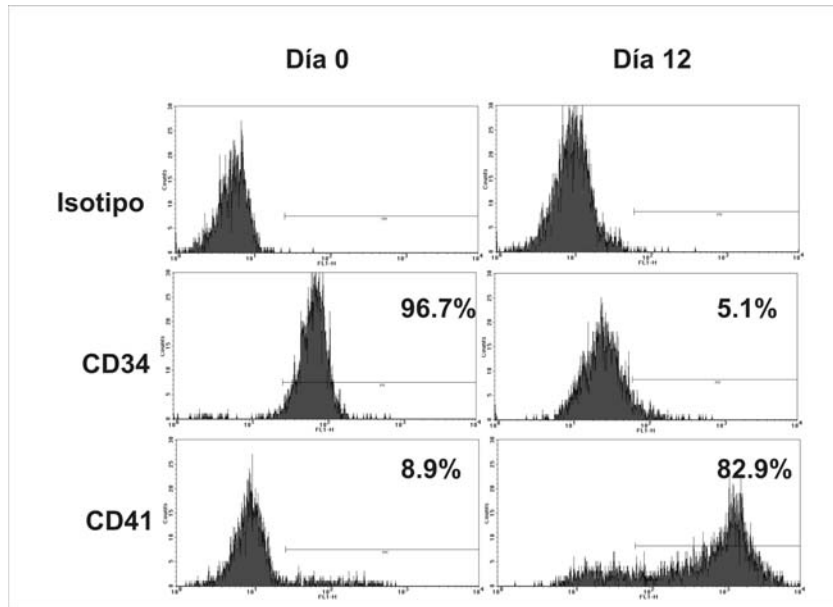


Figura 9. Expresión de CD34 y 41 al inicio y final del cultivo por citometría de flujo. Los histogramas muestran la expresión de estas glicoproteínas (GPs) de membrana en la población total en los días indicados. Los porcentajes de células positivas están indicados en cada histograma.

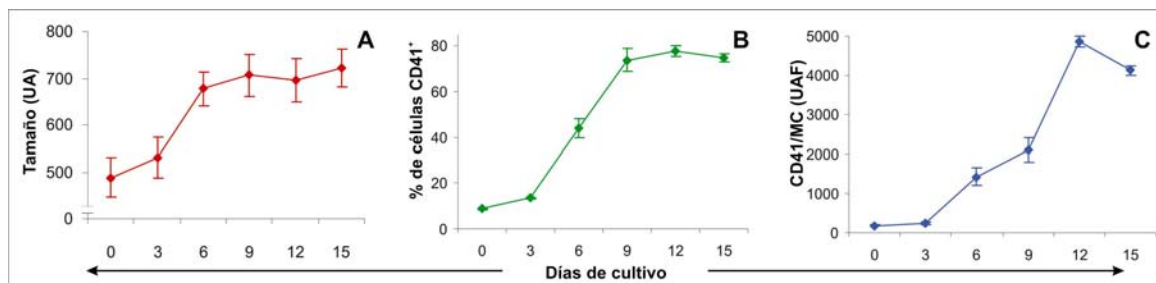


Figura 10. Análisis de la población celular total a lo largo del cultivo. La línea roja (A) muestra la evolución del tamaño de la población celular total expresada en unidades arbitrarias. La línea verde (B) expresa el porcentaje de células CD41⁺ dentro de la población total. La línea azul (C) muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF, expresada en unidades arbitrarias), que refleja la expresión de GPIIb por cada MC.

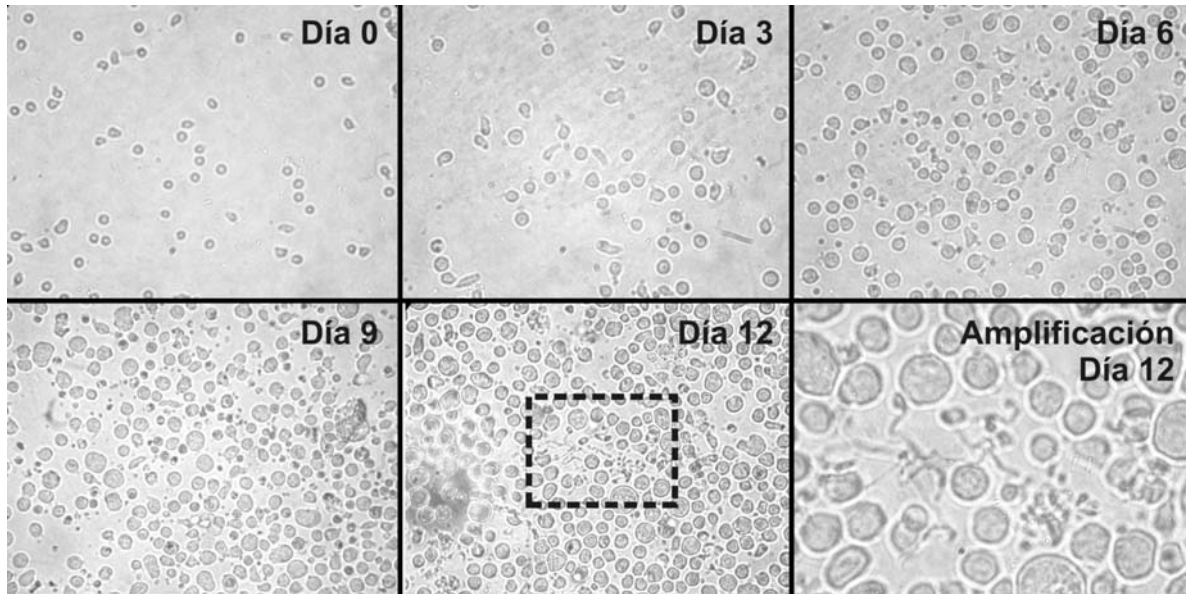


Figura 11. Cinética de la morfología del cultivo por microscopía de contraste de fase. Se muestra un cultivo representativo fotografiado en los días indicados (aumento 450X). El día 12 se pueden observar algunos MCs produciendo proplaquetas (indicado por el recuadro y amplificado 1200X).

3.2.4. Purificación de MCs

Algunos experimentos se realizaron utilizando una suspensión de células altamente enriquecida en MCs los cuales fueron purificados a partir de los cultivos de día 10-12 por inmunoselección magnética positiva utilizando un AcMo. anti-CD61 (clon Y2/51, DakoCytomation California Inc., Carpinteria, USA, 10 minutos a 4°C) siguiendo la metodología descrita previamente [170]. La pureza de la suspensión celular final fue entre 90 y 95 % (determinada por citometría de flujo, según se describe a continuación).

3.3. Inmunomarcación celular para análisis por citometría de flujo

3.3.1. CD34

Para establecer el porcentaje de células CD34⁺, 1 x 10⁴ células se incubaron con una concentración saturante de AcMo. anti-CD34 conjugado con FITC (que reconoce un epítopo diferente al AcMo. utilizado para la purificación) en PBS/SFB 1 % o con una concentración equivalente de isotipo (Immunotech, Marseille, Francia) durante 15 minutos a 4°C. Luego de la fijación con paraformaldehído (PFA, 1 %) las muestras se analizaron por citometría de flujo.

La Figura 12 muestra como ejemplo que, previo a la inmunoselección magnética de CMN de sangre de cordón umbilical (1,09 x 10⁸ células totales), la cantidad de células CD34⁺ en la población total era 1,12 x 10⁶ (1,15-0,12=1,03 %). Luego del procedimiento de separación, se obtuvieron 1,04 x 10⁶ células totales de las cuales el 95,2 % eran CD34⁺ (Figura 13), lo que significa un rendimiento de 88,4 %. Los valores de rendimiento obtenidos en todas las muestras utilizando CMN de médula ósea o sangre de cordón fueron entre 80 y 95 %.

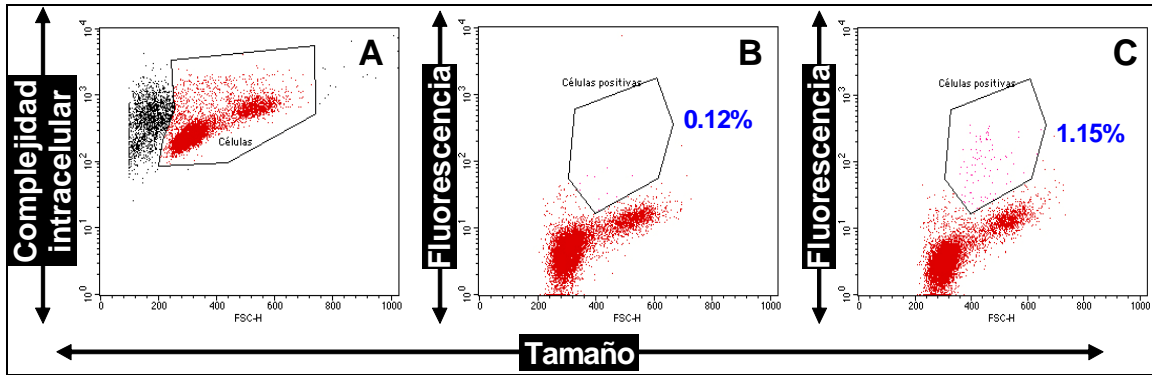


Figura 12. Análisis por citometría de flujo de la población celular total previo a la inmunoselección magnética. Exclusión de *debris* celular (A) (los eventos considerados células se indican en color rojo) y posterior detección de células positivas (indicadas con color violeta) dentro de la región establecida luego de la marcación con un Ac. control de isotipo (B) o con un Ac. anti-CD34 (C), ambos conjugados con FITC.

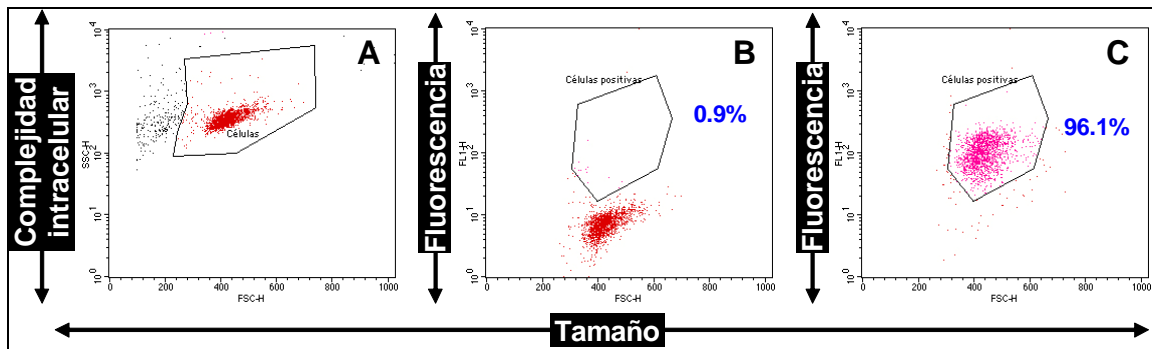


Figura 13. Análisis de la población celular total luego de la inmunoselección magnética por citometría de flujo. El análisis es similar al realizado en la Figura 12.

3.3.2. CD41 y 42b

La frecuencia relativa y madurez de los MCs se determinó incubando 5×10^4 células con un AcMo. anti-CD41 (GP IIb, específica de MCs) conjugado con FITC o un AcMo. anti-CD42b (GP Ib, presente en MCs maduros) conjugado con

PE (Immunotech) durante 15 minutos a 4°C. Luego del agregado de PFA (1 %), las células se analizaron por citometría de flujo.

En todos los casos, el control negativo se realizó incubando las células con un AcMo. IgG₁-FITC o IgG₁-PE irrelevante (Isotipo, Immunotech), en la misma concentración proteica que su correspondiente IgG₁ específica.

3.3.3. Análisis por citometría de flujo

La fluorescencia se midió utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). La emisión del isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la ficoeritrina (PE) (utilizando un láser de argón a 488 nm) se midió con filtros de banda de aproximadamente 525 y 575 nm respectivamente.

Una vez observado el patrón de tamaño (*forward-side scatter*, FSC) en función de la complejidad intracelular (*side-side scatter*, SSC) en un diagrama de puntos, se estableció una región que incluía la población celular excluyendo los restos celulares. A partir de esta población se construyó un gráfico del FSC en función de la fluorescencia correspondiente a la emisión del FITC (FL-1). Se consideraron células positivas aquellas células que mostraron una fluorescencia superior a la del control de isotipo.

3.4. Apoptosis

Los cultivos fueron tratados con los dadores de ON en su mismo medio de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Los dadores de

ON 2,2'-(Hidroxinitrosohidracino)*bis*-etanamina (DETA/ON) y 1-propil-1'-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-nitrosohidrazina (PAPA/ON) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) fueron disueltos en una solución de NaOH 0,01 M y conservados a -70°C. El NPS se disolvió en PBS y se prepararon soluciones frescas para cada experimento.

Las soluciones concentradas de BAY 41-2272 (cedido por Bayer HealthCare, Leverkusen, Alemania), zaprinast y 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, Calbiochem, San Diego, CA, USA) fueron preparadas en DMSO. Una vez preparada, la solución concentrada de ODQ fue conservada a -70°C mientras que el BAY y el zaprinast fueron preparados en el momento. En cada experimento se realizaron las diluciones correspondientes en IMDM. La proporción final de DMSO nunca excedió el 0,04 % del volumen total y la misma no indujo apoptosis.

La muerte celular programada se evaluó por la aparición de diferentes indicadores luego de los tratamientos indicados en cada experimento.

3.4.1. Cambios morfológicos y viabilidad celular

Para detectar cambios morfológicos se utilizó una mezcla de colorantes fluorescentes que se unen al ADN como naranja de acridina (100 µg/ml, Sigma) que difunde libremente y permite diferenciar morfológicamente los núcleos normales de los apoptóticos y bromuro de etidio (100 µg/ml, Sigma) que no penetra en células cuya membrana plasmática esté íntegra y permite diferenciar

entre células viables e inviables. Se evaluaron al menos 200 células en cada experimento utilizando un microscopio de fluorescencia.

3.4.2. Hipodiploidía

La identificación de células apoptóticas fue realizada de acuerdo al protocolo de Tomer y col. [171], con ligeras modificaciones. Las células fueron centrifugadas y luego de descartar el sobrenadante, resuspendidas en PBS conteniendo una concentración saturante de AcMo. anti-CD41 o su correspondiente isotipo, ambos conjugados con FITC. Luego de una incubación de 15 minutos a 4°C, las muestras fueron centrifugadas, resuspendidas en una solución hipotónica conteniendo Tritón X-100 (0,5 %), citrato de sodio (0,1 %), ioduro de propidio (4 µg/ml) y RNAsa A (0,1 mg/ml, Roche) e incubadas durante 15 minutos a 4°C. Los MCs (células CD41⁺) con núcleo hipodiploide (menor de 2N) fueron determinados por análisis citofluorométrico de dos colores (FL-1 vs FL-3).

3.4.3. Expresión de caspasa-3 activada

Las células fueron fijadas y permeabilizadas con un kit comercial (Fix & Perm, Beckman Coulter, Franklin Lakes, NJ, USA) según las instrucciones del fabricante. A continuación fueron marcadas durante 2 horas con un Ac. policlonal generado en conejo y dirigido contra la forma activada de la caspasa-3 humana (Cell Signalling Technology, Inc., Beverly, MA, USA). Finalmente, las células

fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con FITC (DakoCytomation). El control de unión inespecífica se realizó utilizando inmunoglobulinas de conejo en la misma concentración del Ac. específico. El porcentaje de células que expresaron caspasa-3 activada fue analizado por citometría de flujo excluyendo el *debris* celular y las plaquetas por sus características de tamaño y complejidad intracelular.

3.4.4. Determinación de la actividad de caspasa-3

La actividad enzimática fue evaluada por el clivaje del sustrato específico Ac-DEVD-pNA (Calbiochem). Los MCs fueron lavados con PBS/EDTA/BSA, lisados con una solución tampón compuesta por Tris-HCl (50 mM) (pH 7,4), EDTA (1 mM), EGTA (10 mM), digitonina (10 μ M), fenilmetilsulfonil fluoruro (0,5 μ M), aprotinina (1,5 μ M), pepstatina (14,6 μ M) y benzamidina (63,9 μ M). Los lisados fueron clarificados por centrifugación y la actividad caspasa-3-like fue determinada en los sobrenadantes por espectrofotometría 2 horas después de agregado el sustrato. El sustrato sólo fue utilizado como blanco y su absorbancia fue descontada de cada muestra. La liberación de pNA fue registrada a 405 nm utilizando un lector de microplacas y la actividad enzimática fue expresada como unidades de absorbancia de pNA (A405) por 10^6 células.

3.4.5. Determinación de Bcl-xL

Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas durante 30 minutos con un AcMo. anti-Bcl-xL conjugado con FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA). El control de unión inespecífica se realizó utilizando un AcMo. del mismo isotipo conjugado con FITC (Immunotech). La mediana de intensidad de fluorescencia fue analizada por citometría de flujo excluyendo el *debris* celular y las plaquetas.

3.5. Determinación de nucleótidos cíclicos

MCs purificados (5×10^5 /ml) fueron tratados con ODQ y/o PAPA/ON durante 15 minutos a 37°C. Luego las muestras fueron lisadas con una solución de Tritón X-100 (1 %) en HCl (0,1 N). El contenido de GMPc fue cuantificado utilizando un kit comercial de ELISA (ensayo inmunoabsorbido unido a una enzima) de acuerdo con las indicaciones del fabricante acetilando las muestras previamente (Assay Design, Inc., Ann Arbor, MI, USA).

3.6. Detección de productos generados por el metabolismo del óxido nítrico

El ON producido por las células difunde libremente y una parte se transforma en nitratos o nitritos (NO_x) en los sobrenadantes de cultivo. Para su detección, los nitratos fueron reducidos a nitritos por el agregado de la enzima nitrato reductasa y NADPH (Sigma). Luego, se mezclaron 100 µl de muestra, 50 µl de sulfanilamida (1 %) en HCl (1M) y 50 µl de N-(1-naftil)-etilendiamina (0,1 %)

por 10 minutos a TA (Sigma, reacción de Griess). La densidad óptica fue determinada a 550 nm y la concentración de nitritos fue establecida a partir de una curva de nitrito de sodio (Sigma) realizada en cada experimento sustrayendo la absorbancia debida al medio de cultivo.

3.7. Formación de plaquetas en cultivo

La generación de plaquetas en cultivos de MCs derivados de sangre de cordón umbilical se estudió por citometría de flujo según el protocolo descrito por Norol y col. [172].

Brevemente, luego del tratamiento o no con ON, la suspensión celular fue centrifugada 10 minutos a 1500 RPM en presencia de EDTA (2 mM). Los pellets fueron resuspendidos en un mismo volumen de PBS conteniendo AcMo. anti-CD41-FITC y luego de una incubación durante 15 minutos a 4°C, cada muestra fue resuspendida en Isoton II (Coulter Electrónica S.A, Buenos Aires, Argentina) hasta completar un volumen final de 400 µl. Cada muestra fue adquirida con una tasa de flujo de 1 µl/segundo durante 100 segundos. La región de análisis fue determinada utilizando las propiedades *scatter* de plaquetas de sangre periférica humana tratadas de manera similar. Esta región excluye las células grandes (MCs) y el *detritus* celular o micropartículas. De tal manera que el número de plaquetas fue inferido de los eventos CD41⁺ dentro de la región de análisis.

3.8. Determinación de MCs formadores de proplaquetas

Se transfirieron 10.000 MCs derivados de sangre de cordón umbilical de día 11 de cultivo a microplacas conteniendo medio IMDM suplementado con 5 % de plasma humano libre de plaquetas y luego fueron tratados o no con PAPA/ON. Luego de 24 horas las proplaquetas se cuantificaron utilizando un microscopio invertido con contraste de fase (Figura 11, página 62). El número total de MCs formadores de proplaquetas (considerado como un MC que presente una o más elongaciones citoplasmáticas de un largo mayor al diámetro del MC) fue determinado y normalizado al número total de MCs en el pocillo [173].

3.9. Adhesión de MCs a células endoteliales (CE)

3.9.1. Cultivo de CE

Las CE fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales de partos normales o cesáreas según la técnica descrita por Jaffe y col. [174]. Brevemente, se ligaron los extremos libres de la vena umbilical, colocando una llave de tres vías en uno de ellos para permitir la introducción de los diferentes reactivos. Luego se realizó un lavado exhaustivo con PBS y las CE fueron removidas del subendotelio por tratamiento enzimático con colagenasa tipo IV (0,3 mg/ml) durante 15 minutos. La suspensión celular fue recolectada en un tubo conteniendo una solución de suero fetal bovino (SFB) 10 % en PBS (PBS/SFB) y luego de su centrifugación, el pellet fue resuspendido en medio de crecimiento: RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) conteniendo SFB (10 %), PS (100 U/ml

y 100 µg/ml, respectivamente), suplemento comercial de cerebro bovino para el crecimiento de CE (150 µg/ml), heparina (45 µg/ml), glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM) y 2-mercaptoetanol (50 µM) (Sigma). Las células fueron incubadas en frascos de cultivo previamente gelatinizados dentro de una estufa gaseada a 37°C con 5 % de CO₂.

Luego de 24 horas, las células no adherentes fueron eliminadas y se agregó medio fresco continuando el cultivo hasta su confluencia. Las monocapas fueron despegadas con una solución de tripsina/EDTA (0,5 % y 0,2 g/L respectivamente) y sembradas en nuevos frascos o placas de 24 pocillos. Se utilizaron monocapas confluentes y para los ensayos de adhesión el medio de crecimiento fue reemplazado por IMDM suplementado con SFB 1 % y MgCl₂ 1mM. Se utilizaron CE del primer al tercer pasaje. Para descartar la interferencia por lipopolisacáridos algunos experimentos fueron realizados en presencia de Polimixina B (0,7 µg/ml, Sigma).

3.9.2. Identificación de CE

Las células fueron despegadas con una solución de tripsina/EDTA, lavadas, fijadas y permeabilizadas (Fix & Perm). Luego, fueron incubadas con un AcMo. anti-factor von Willebrand (fVW, DakoCytomation) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, las células fueron lavadas e incubadas durante 30 minutos con fragmentos Fab2' de un Ac. anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con FITC. Luego de un lavado, las

muestras fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 14). El control de isotipo fue realizado reemplazando el AcMo. anti-fvW por otro irrelevante del mismo isotipo.

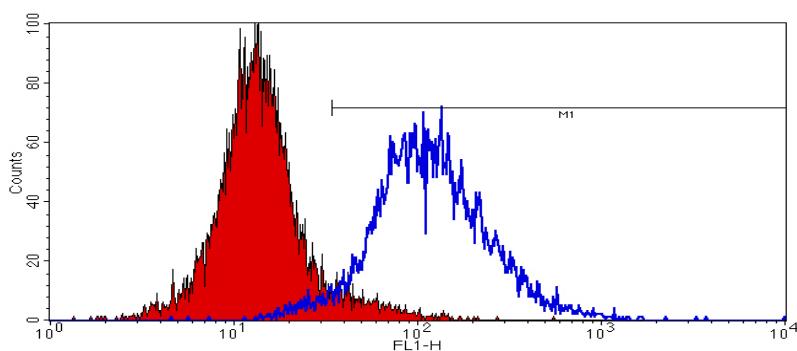


Figura 14. Expresión de fvW intracelular en CE. Los histogramas muestran la población celular que expresa fvW (línea azul) o su correspondiente control de isotipo (área roja). En este ejemplo el porcentaje de células positivas (comprendidas dentro de cursor “M1”) es de 97 % y provienen de un segundo repique.

3.9.3. Marcación de MCs con ^{51}Cr

La marcación radiactiva de MCs se realizó de acuerdo al método de Yu y col. con algunas modificaciones [175]. Los MCs (500.000 totales) fueron lavados con PBS/EDTA (2 mM) y resuspendidos en 20 μl de SFB a los cuales se agregaron 100 μl de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Esta suspensión fue incubada durante 90 minutos a 37°C con agitación. Luego de la marcación, el ^{51}Cr y las células muertas fueron eliminados por centrifugación (4 veces sobre un colchón de BSA 5 %) y las células fueron resuspendidas en IMDM conteniendo SFB (1 %) y MgCl_2 (1 mM). La viabilidad celular fue mayor del 95 % por exclusión de azul de trypan.

3.9.4. Ensayos de adhesión de MCs a CE

Los MCs marcados (contenidos en un volumen de 100 μ l) fueron depositados sobre monocapas confluentes de CE. Todos los ensayos y controles fueron realizados por duplicado. La adhesión se desarrolló en estufa gaseada durante 60 minutos. Los MCs no adheridos fueron eliminados mediante 3 lavados con IMDM, SFB 1 % y $MgCl_2$ 1 mM mantenido a 37°C. Los complejos MC-CE fueron lisados con 200 μ l de una solución de Tritón X-100 (0,1 %) en PBS a TA durante 30 minutos. La emisión γ fue cuantificada en un contador de centelleo y el porcentaje de adhesión fue calculado por la fórmula:

$$\%_{\text{adhesión}} = \frac{\text{cpm de 100 } \mu\text{l de lisado}}{\text{cpm de 100 } \mu\text{l de 30.000 MCs lisados}} \times 100$$

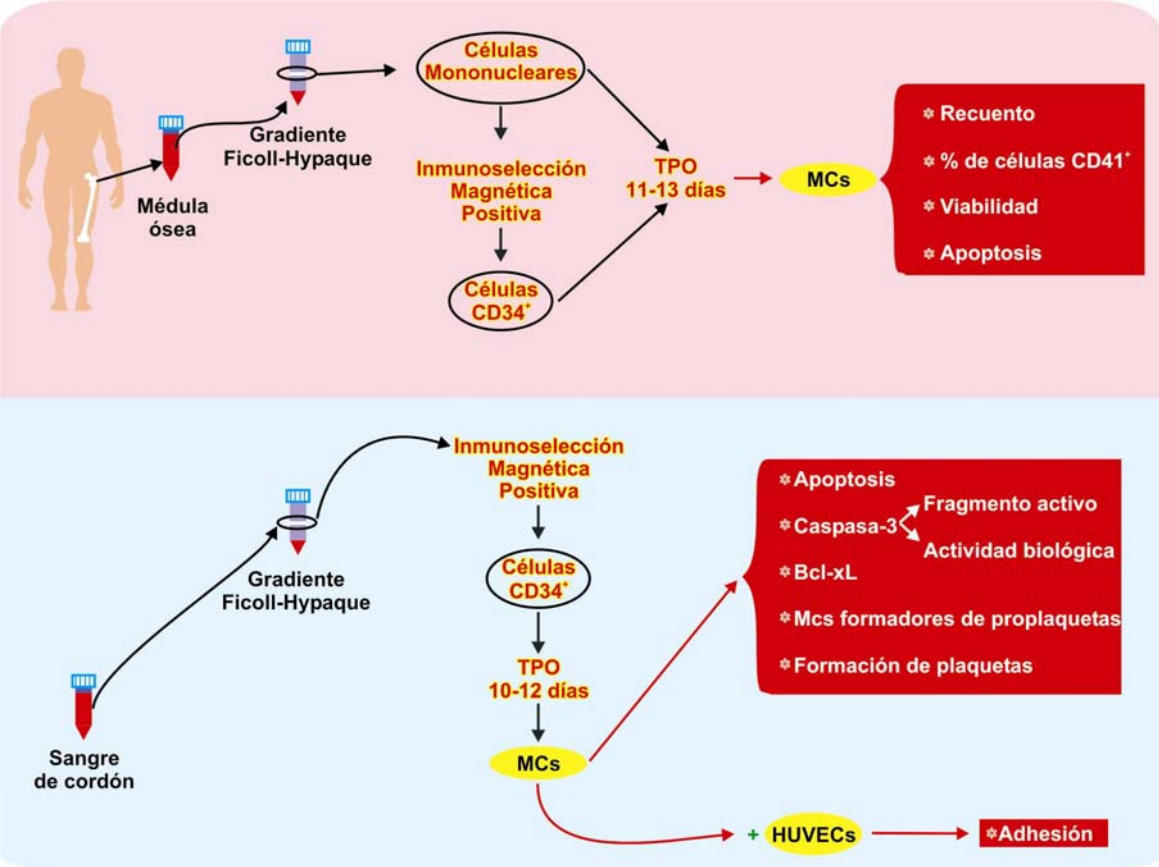
Para estudiar el rol de ON en la adhesión de MCs a CE se establecieron las condiciones experimentales de mayor sensibilidad colocando diferentes concentraciones de MCs sobre monocapas 100 % confluentes de CE. La adhesión fue dependiente del número de MCs de manera lineal hasta 30.000 MCs/pocillo (n=4).

En algunos experimentos, los MCs marcados primero fueron tratados con NPS durante 15 minutos a 37°C y luego fueron colocados sobre las monocapas de CE. En otros, las CE fueron estimuladas con factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , 10 ng/ml) durante 4 horas y luego de 2 lavados fueron utilizadas para los ensayos de adhesión.

3.10. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando la prueba estadística t de Student o el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la modificación de Newman-Keuls según corresponda. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS

4.1. Inhibición del crecimiento de megacariocitos (MCs) por Dietilentetraamina NONOato (DETA/ON)

Para estudiar el papel del ON sobre el crecimiento de MCs, cultivos de células mononucleares (CMN) de médula ósea fueron tratados con el dador DETA/ON y estimulados con trombopoyetina (TPO). Luego de 11-13 días de cultivo, se observó una disminución en el número de MCs que resultó ser dependiente de la concentración del dador de ON (EC_{50} de 112 μ M, Figuras 15 y 16). El efecto inhibitorio del DETA/ON se correlacionó con una disminución tanto del número de células totales como del porcentaje de células CD41⁺ (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del DETA/ON sobre el número de células totales y el porcentaje de células CD41⁺ en cultivos de CMN estimulados con TPO.

DETA/ON (μ M)	Células totales ($\times 10^3$)	Células CD41 ⁺ (%)
0	1031 \pm 51	25 \pm 5
10	1048 \pm 65	25 \pm 4
20	955 \pm 145	25 \pm 5
60	893 \pm 140	23 \pm 4
125	660 \pm 116*	17 \pm 3*
250	487 \pm 165*	13 \pm 3*
500	302 \pm 130*	7 \pm 5*

Los valores representan la media \pm EE de 6 experimentos independientes. * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos y control.

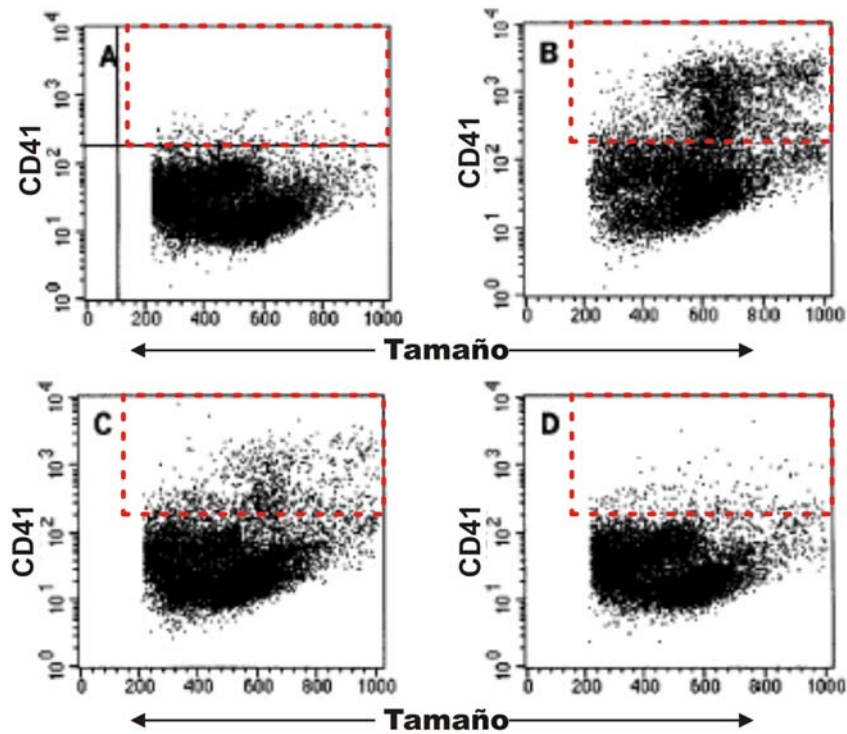


Figura 15. Inhibición del crecimiento de MCs por DETA/ON. $7,5 \times 10^5$ CMN fueron estimuladas con TPO en ausencia (B), o presencia de DETA/ON 250 μ M (C) o 500 μ M (D). Luego de 11-13 días de cultivo, las células fueron marcadas con un AcMo. anti-CD41 (B-D) o una concentración equivalente de un AcMo. isotópico irrelevante (A), ambos conjugados con FITC. Los recuadros de línea punteada roja contienen las células CD41⁺. La figura muestra un experimento representativo de 6 similares.

Con el fin de establecer si el efecto citotóxico era debido específicamente al ON y no a la molécula transportadora o a los nitritos resultantes del metabolismo del ON, se evaluó si algunos de ellos mostraban efectos similares al DETA/ON. Los cultivos de CMN incubados con DETA o nitrito de sodio no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de los cultivos control (Figura 16).

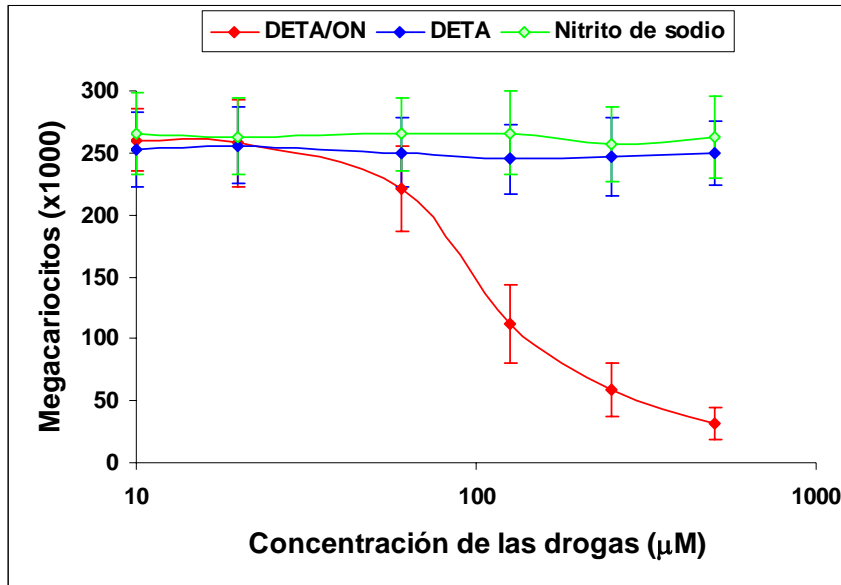


Figura 16. Inhibición del crecimiento de MCs por DETA/ON. $7,5 \times 10^5$ CMN fueron tratadas con diferentes concentraciones de DETA/ON, DETA o nitrito de sodio, previo a la estimulación con TPO. El número de MCs totales fue determinado entre los días 11 y 13 de cultivo. Los valores representan la media \pm error estándar (EE) de 6 experimentos independientes para DETA/ON o de 4 experimentos independientes para DETA o nitrito de sodio.

4.2. Inhibición del crecimiento de MCs por nitroprusiato de sodio (NPS)

El DETA/ON es un dador de ON con una cinética de liberación lenta; en condiciones normales de cultivo (pH 7,4 y 37°C) su vida media es de 20 horas. En los experimentos detallados a continuación analizamos el efecto de otro dador químicamente no relacionado, como el NPS, que se caracteriza por liberar ON espontáneamente en las mismas condiciones de pH y temperatura. La Figura 17 muestra que el NPS agregado el primer día de cultivo, de manera similar al DETA/ON, inhibió la formación de MCs en forma dependiente de la concentración. El efecto inhibitorio no fue causado por la generación de cianuro proveniente del metabolismo del NPS ya que como se observa en la misma Figura, el número de

MCs producidos en los cultivos tratados con ferricianuro de potasio en el mismo rango de concentraciones no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores control.

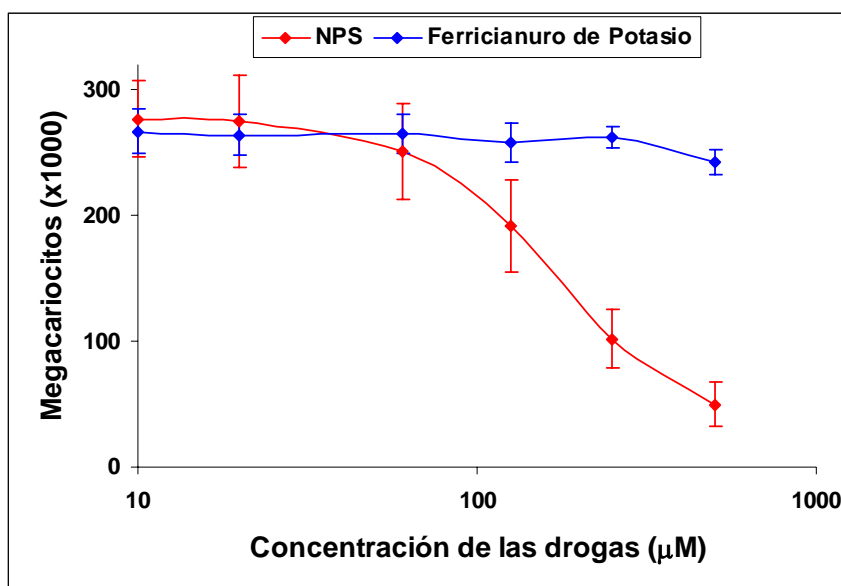


Figura 17. Inhibición del crecimiento de MCs por NPS. $7,5 \times 10^5$ CMN fueron tratadas con diferentes concentraciones de NPS o ferricianuro de potasio, previo a la estimulación con TPO. El número de MCs totales fue determinado entre los días 11 y 13 de cultivo. Los valores representan la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

4.3. Efecto del NPS sobre el crecimiento de MCs inducido por interleuquina-3 (IL-3)

Con el fin de investigar si la inhibición mediada por ON estaba relacionada con un mecanismo específico involucrado en el crecimiento de MCs mediado por TPO, las CMN se estimularon con un factor de crecimiento de menor especificidad para el linaje megacariocítico, como es la (IL-3) [176] en presencia de NPS. Luego de 12 días de cultivo en presencia de esta citoquina se obtuvo un

desarrollo de MCs menor que cuando se utilizó TPO como factor de crecimiento. De todas maneras, en estas condiciones de cultivo, el NPS también fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de MCs (Figura 18).

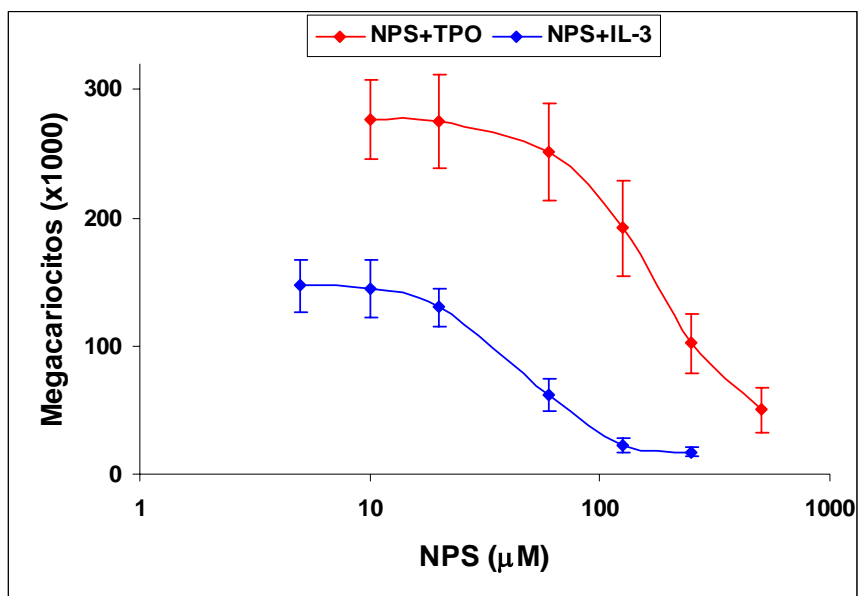


Figura 18. Inhibición del crecimiento de MCs por NPS en cultivos de CMN estimulados con diferentes factores de crecimiento. $7,5 \times 10^5$ CMN fueron estimuladas con TPO o IL-3 (10 ng/ml) luego del agregado de NPS. El número de MCs totales fue determinado el día 12 de cultivo. Los valores representan la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

4.4. Rol del ON endógeno en la proliferación de MCs

Considerando que el ON inhibió la proliferación de células de la médula ósea y que la iNOS puede ser inducida en diferentes tipos celulares, en los siguientes experimentos evaluamos si el ON generado de manera endógena podía ser capaz de inhibir el crecimiento de MCs. Con este fin, los cultivos de CMN fueron tratados con drogas que estimulan la expresión de iNOS en CMN

como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , 10 ng/ml) y el interferón- γ (IFN- γ , 100 U/ml) [126] previo al agregado de TPO y luego se evaluó el número de MCs. La Figura 19 muestra que el tratamiento de los cultivos con las mencionadas citoquinas resultó en una significativa inhibición de la proliferación de MCs. El pretratamiento de las CMN con dos inhibidores de la síntesis de ON, N^G-Nitro-L-Arginina-Metil Ester (L-NAME) o N^G-Monometil-L-arginina (L-NMMA) revirtió parcialmente el efecto supresor mediado por las citoquinas.

La estimulación de la síntesis enzimática de ON promueve la acumulación de sus metabolitos estables (nitratos y nitritos), por lo cual se evaluó la concentración de estos productos (NO_x) en sobrenadantes de cultivo. Luego de 72 horas de estimulación con TNF- α e IFN- γ se observó un aumento significativo en los niveles de estos compuestos respecto de los cultivos sin estimular. Este aumento de ON fue suprimido por la preincubación de los cultivos con los inhibidores de su síntesis (Figura 19).

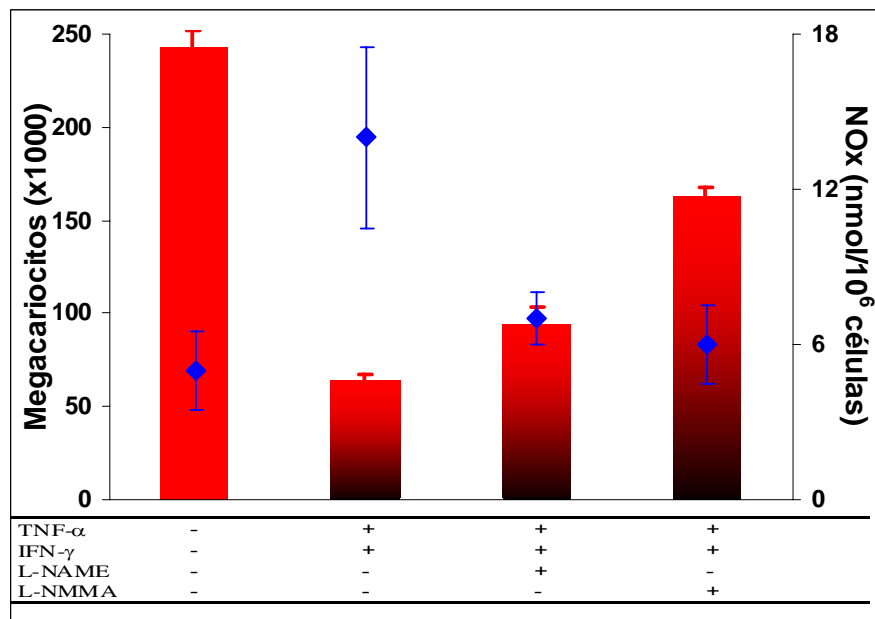


Figura 19. Efecto de citoquinas proinflamatorias sobre la proliferación de MCs y la producción de ON en CMN. CMN fueron tratadas en presencia o no los de inhibidores de NOS, L-NAME o L-NMMA (500 μ M). El número de MCs (barras) y la producción de nitratos + nitritos en sobrenadantes (expresadas como NOx, rombos) fueron determinados entre los días 11 y 13 de cultivo o 72 horas luego de la estimulación con TPO, respectivamente. Los valores representan la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

4.5. Efecto del DETA/ON sobre el crecimiento de MCs derivados de células CD34 $^{\pm}$

La influencia de las células accesorias de la médula ósea, favoreciendo el crecimiento y diferenciación de MCs por la secreción de factores solubles, ha sido documentada previamente [54, 166, 177]. Considerando que las CMN incluyen no sólo progenitores sino también dichas células accesorias, el efecto del ON podría ser ejercido a través de estas últimas o directamente sobre los progenitores hematopoyéticos. Con el fin de establecer el tipo celular sobre el cual el ON ejerce sus efectos citotóxicos, evaluamos la acción del ON en cultivos enriquecidos en

células CD34⁺. En estas condiciones, el ON bloqueó la formación de MCs con mayor eficacia que en aquellos cultivos desarrollados a partir de CMN, como se observa en la Figura 20, siendo su EC₅₀ de 33 μM, un valor cuatro veces menor que el hallado en cultivos mixtos.

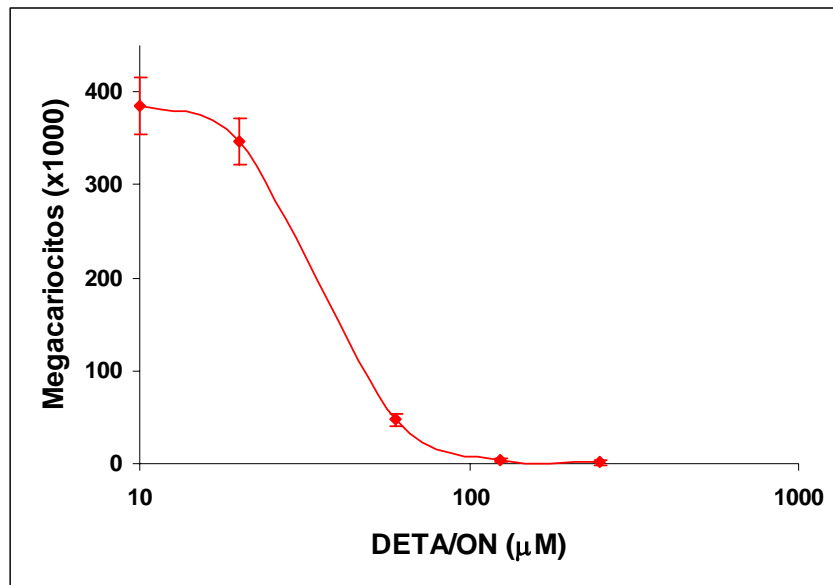


Figura 20. Efecto del DETA/ON sobre MCs derivados de células CD34⁺. 5 x 10⁴ células CD34⁺ fueron tratadas con diferentes concentraciones de DETA/ON, previo a la estimulación con TPO. El número de MCs totales fue determinado entre los días 11 y 13 de cultivo. Los valores representan la media ± EE de 5 experimentos independientes.

4.6. Rol del ON endógeno en la proliferación de MCs derivados de células CD34[±]

El hecho de que el DETA/ON fuera capaz de suprimir el crecimiento de las células CD34⁺ directamente planteó la posibilidad de que existiera en estas células, al igual que en CMN, un mecanismo supresor mediado por ON generado

de manera endógena. Para comprobar esta hipótesis, células CD34⁺ fueron estimuladas con TNF- α e IFN- γ . Como se puede observar en la Figura 21, la presencia de estas citoquinas disminuyó significativamente la generación de MCs. Uno de los mediadores involucrados sería el ON ya que el efecto inhibitorio fue menor por la preincubación de los cultivos con los inhibidores de la síntesis de ON (Figura 21). Más aún, el suplemento del cultivo con L-arginina, sustrato de la síntesis enzimática de ON, dio como resultado una inhibición de la proliferación de MCs. Por otra parte, el pretratamiento del cultivo con L-NAME no sólo revirtió este efecto sino que además promovió un aumento en la generación de MCs (Figura 21).

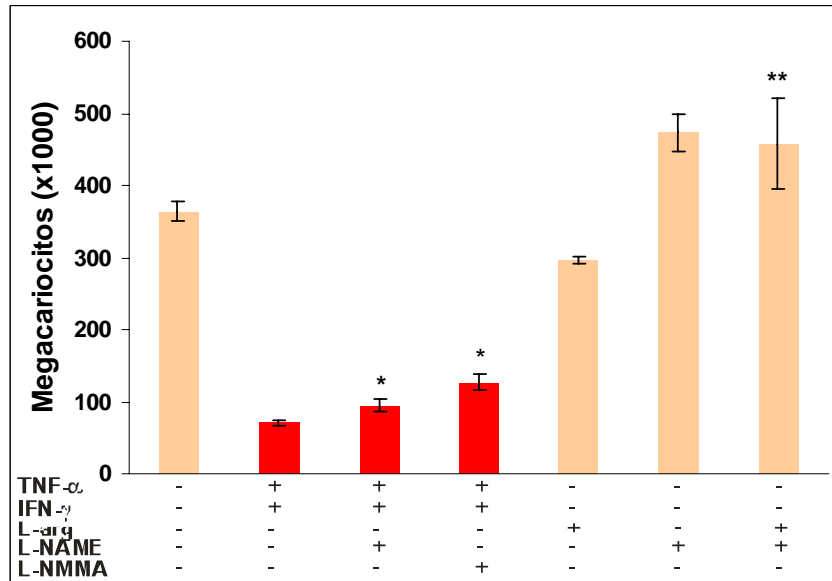


Figura 21. Efecto del ON sobre MCs derivados de células CD34⁺. 5 x 10⁴ células fueron tratadas con L-arginina (L-arg, 1 mM) o con TNF- α (10 ng/ml)+ IFN- γ (100 U/ml) en presencia o ausencia de L-NMMA o L-NAME (ambos 500 μ M). El número de MCs fue determinado entre los días 11 y 13 de cultivo. Los valores representan la media \pm EE de 4 experimentos independientes. *p<0,05 vs. citoquinas solas vs. L-arg. **p<0,05.

4.7. Efecto del agregado de DETA/ON en diferentes tiempos luego de la estimulación de células CD34[±] con TPO

Los cultivos líquidos, a diferencia de aquellos desarrollados en medios semisólidos, permiten trabajar con células en distintos estadios de diferenciación mediante la recolección de células en diferentes días de cultivo.

En nuestras condiciones experimentales, las células mostraron una fase inicial proliferativa seguida de un proceso de diferenciación y maduración, de modo tal que el día 9 de cultivo el número de células inicial se multiplicó 4 ± 1 veces (n=9) y el porcentaje de células CD41⁺ alcanzó su valor máximo (86 ± 3 % de células CD41 positivas, n=9). Para determinar el efecto del ON en los distintos estadios de diferenciación, la exposición de células al DETA/ON (125 μ M) se realizó en diferentes días de cultivo y en todos los casos el número de MCs y la viabilidad celular se evaluaron el día 11.

Como muestra la Tabla 2, el agregado de DETA/ON entre el día 1 y 7 de cultivo provocó la muerte del mismo. En cambio, el tratamiento de los cultivos con ON el día 8 produjo la muerte del 50% de las células y la viabilidad fue de apenas 30%. La adición de DETA/ON los días 9 ó 10 post estimulación con TPO, no cambió significativamente la generación de MCs respecto al control pero la viabilidad celular se encontró marcadamente disminuida (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del agregado de DETA/ON en diferentes días de cultivo sobre el número de MCs.

Día de cultivo en el cual fue adicionado el DETA/ON	Megacariocitos totales el día 11 (% del control)	Viabilidad (% del control)
1-7	Menos de 20	Menos de 20
8	50 ± 10	30 ± 6
9	100	42 ± 5
10	100	60 ± 8

El DETA/ON (125 μ M) fue agregado a los cultivos en los días indicados. El número absoluto de MCs y la viabilidad celular (por exclusión de azul de trypan) fueron determinados el día 11 de cultivo. Los valores representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

4.8. El DETA/ON induce la muerte celular programada de células CD34[±] y MCs

Con el fin de evaluar si la inducción de muerte celular programada era una de las causas asociadas al efecto citotóxico del ON, células CD34⁺ fueron tratadas con ON, estimuladas con TPO y luego de 96 horas se evaluó la disminución del contenido de ADN nuclear como indicador de células apoptóticas. Como se observa en la Figura 22, el análisis cuantitativo de la población hipodiploide por citometría de flujo mostró un aumento significativo como consecuencia del tratamiento con DETA/ON.

A continuación se analizó la cinética de aparición de células apoptóticas como respuesta al tratamiento con ON por citometría de flujo. El análisis diario de

los cultivos mostró que el porcentaje de células apoptóticas aumentó luego de 24 horas de exposición al DETA/ON. La proporción de células apoptóticas fue mayor cuanto mayor fue el tiempo de incubación con el dador (Tabla 3).

Para poder establecer si el efecto proapoptótico del ON también ocurría en MCs, se repitieron los mismos experimentos utilizando cultivos obtenidos luego de 9 días de estimulación de células CD34⁺ con TPO. En la Tabla 3 se puede observar no sólo que la apoptosis basal de los MCs fue mayor en aquellos más maduros sino que también estas células son más susceptibles al estímulo apoptótico del ON respecto de las células indiferenciadas.

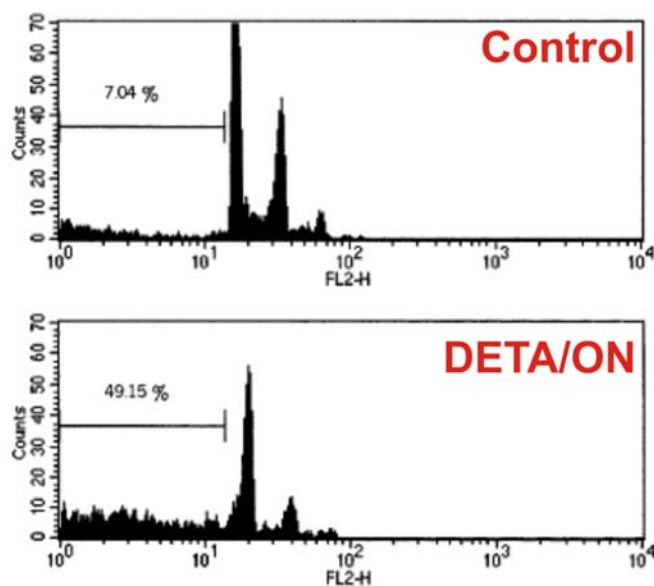


Figura 22. Análisis de la apoptosis inducida por DETA/ON por citometría de flujo. Células CD34⁺ fueron tratadas (gráfico inferior) o no (gráfico superior) con DETA/ON (125 μ M), previo a la estimulación con TPO. Luego de 96 horas las células fueron marcadas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Se muestra 1 experimento representativo de 4 similares.

Tabla 3. Porcentaje de apoptosis de células CD34⁺ y MCs inducida por DETA/ON.

Horas post DETA/ON	Células CD34 ⁺		Megacariocitos	
	Control	DETA/ON	Control	DETA/ON
24	4 ± 0,8	12 ± 2	7 ± 0,4	36 ± 3
48	6 ± 0,8	30 ± 3	10 ± 0,8	54 ± 5
72	6 ± 0,4	34 ± 4	11 ± 0,8	69 ± 2
96	7 ± 0,3	45 ± 4	16 ± 0,4	67 ± 8

Células CD34⁺ o MCs (derivados de cultivos de células CD34⁺ estimuladas con TPO por 9 días) fueron tratados con DETA/ON. Las células CD34⁺ fueron estimuladas luego con TPO. En los tiempos indicados luego de la adición de DETA/ON, el porcentaje de células hipodiploides fue evaluado por citometría de flujo. Los valores representan la media ± EE de 3 experimentos independientes.

4.9. Efecto del 8-Br-GMPc en la apoptosis de MCs inducida por ON

La activación de la guanilato ciclasa soluble y consecuentemente el aumento del GMPc es uno de los principales mediadores del mecanismo de acción del ON [102]. Para poder establecer la implicancia de este segundo mensajero en el efecto citotóxico del ON utilizamos un análogo permeable denominado 8-Br-GMPc. El tratamiento de células CD34⁺ con esta droga no afectó el número de MCs obtenidos luego de 11 días de cultivo en presencia de TPO respecto a muestras control (398 ± 98, 438 ± 109, 420 ± 70 x 10³ MCs para 0, 3 y 6 mM respectivamente, n = 3).

4.10. Apoptosis inducida por ON sobre MCs derivados de células CD34[±] de sangre de cordón umbilical

Durante el desarrollo de los experimentos descritos previamente nos encontramos con dificultades para la obtención de las muestras de médula ósea. La disminución en la frecuencia de las cirugías llevadas a cabo en los hospitales involucrados y el hecho de que los pocos pacientes fueran añosos (presentando casi siempre muestras hipocelulares) nos llevó a cambiar la fuente de células CD34⁺. Por ello, los experimentos que se detallan a continuación fueron realizados en MCs obtenidos luego de 10-12 días de estimulación con TPO de células CD34⁺ purificadas de sangre de cordón umbilical (ver materiales y métodos).

Respecto del dador de ON, como se ha mencionado previamente, el DETA/ON posee una vida media de 20 horas. Para poder estudiar el efecto de inhibidores utilizamos otra molécula químicamente relacionada pero con una menor vida media (15 minutos) denominada 1-propil-1'-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-nitrosohidrazina (PAPA/ON).

En primer lugar estudiamos la inducción de apoptosis utilizando este nuevo dador de ON en un rango similar al utilizado con el DETA/ON en los experimentos de CMN o CD34⁺ de médula ósea. Las Figuras 23 y 24 muestran que los MCs derivados de sangre de cordón umbilical también son susceptibles a los efectos proapoptóticos del ON (EC₅₀ de 98 μM). Si bien los estudios se realizaron determinando la apoptosis en la población megacariocítica (utilizando cultivos que tuvieran al menos 75% de células CD41⁺ y estableciendo el porcentaje de células

con núcleo hipodiploide solo en la fracción CD41⁺ por citometría de flujo (ver Materiales y Métodos), el efecto del PAPA/ON se evaluó en una población altamente enriquecida en MCs (98% de células CD41⁺, ver materiales y métodos). Los resultados obtenidos confirmaron que la apoptosis mediada por ON ocurre en la población megacariocítica aún en ausencia de cualquier otro tipo celular contaminante (Control: 18, PAPA/ON: 56 % de apoptosis, microscopía de fluorescencia, n=2).

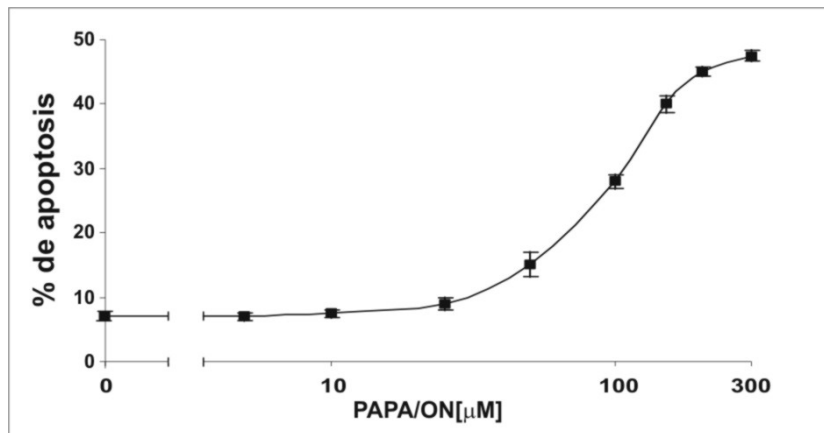


Figura 23. Análisis de la apoptosis por microscopía. MCs derivados de células CD34⁺ estimuladas con TPO durante 10 días fueron tratados con PAPA/ON y la apoptosis se determinó luego de 24 horas (n=5).

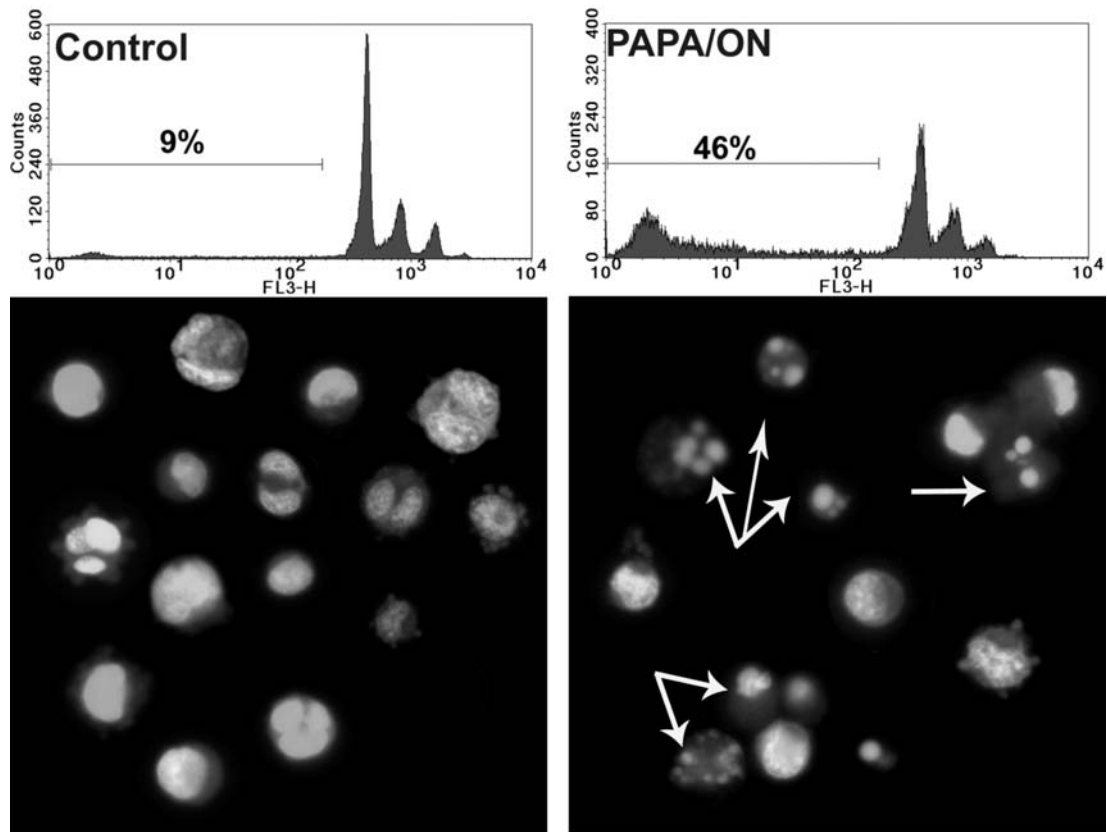


Figura 24. Análisis de la apoptosis por microscopía y citometría de flujo. MCs derivados de células CD34⁺ estimuladas con TPO durante 10 días fueron tratados (derecha) o no (izquierda) con PAPA/ON (125 μ M). La apoptosis se determinó por citometría de flujo (arriba) y por microscopía de fluorescencia (abajo) luego de 24 horas. Se muestra 1 experimento representativo de 5 experimentos independientes. Las flechas indican células apoptóticas. Aumento 400X.

4.11. Mecanismos involucrados en la muerte de MCs inducida por ON

4.11.1. Rol del GMPc en la apoptosis de MCs inducida por ON

En un trabajo publicado durante el desarrollo de este trabajo de Tesis [178], los autores demostraron que la apoptosis inducida por ON en células de la línea megacariocítica Meg-01 era mediada por GMPc. A pesar de que nuestros estudios previos no mostraron efectos inhibitorios en la generación de MCs por 8-

Br-GMPc, reexaminamos el rol de este nucleótido cíclico utilizando otro análogo permeable que presenta una lipofilicidad 20 veces mayor que el 8-Br-GMPc, denominado 8-pCPT-GMPc [179]. Sorprendentemente, luego del tratamiento de los cultivos con este análogo encontramos un aumento del porcentaje de células apoptóticas en relación directa con su concentración ($EC_{50} = 230 \mu\text{M}$, Figura 25-A).

Frente a estos resultados en los siguientes experimentos profundizamos la participación del GMPc en la acción proapoptótica del ON utilizando diferentes drogas moduladoras de los niveles intracelulares de este segundo mensajero. En primer lugar se utilizó ODQ que es un inhibidor de la guanilato ciclasa [112]. En estas condiciones, el porcentaje de apoptosis inducido por PAPA/ON fue inhibido significativa aunque no totalmente, mientras que los niveles intracelulares de GMPc permanecieron en valores similares a las células no estimuladas con PAPA/ON (Figura 25-B). En los experimentos siguientes, se analizó el efecto de un activador directo de la guanilato ciclasa, BAY 41-2272 [180]. Como se puede observar en la Figura 26 la activación de esta enzima gatilló apoptosis en forma concentración-dependiente y la misma fue suprimida por el pretratamiento de los MCs con ODQ.

Los aumentos de GMPc son rápidamente contrarrestados por una familia de fosfodiesteras. El pretratamiento de los MCs con zaprinast ($40 \mu\text{M}$), un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE) V (descrito inicialmente como M&B 22,948) [181], enzima que degrada específicamente al GMPc, no mostró un efecto por sí mismo (control: 20 ± 3 ; zaprinast: 22 ± 3 % de apoptosis; $n=5$) sin embargo, la

presencia de zaprinast sensibilizó a los MCs frente al efecto proapoptótico del PAPA/ON (PAPA/ON 20 μ M: $21 \pm 3,6$, zaprinast+PAPA/ON: $35 \pm 3,2$ % de apoptosis, $p < 0,05$, $n = 5$, Figura 27).

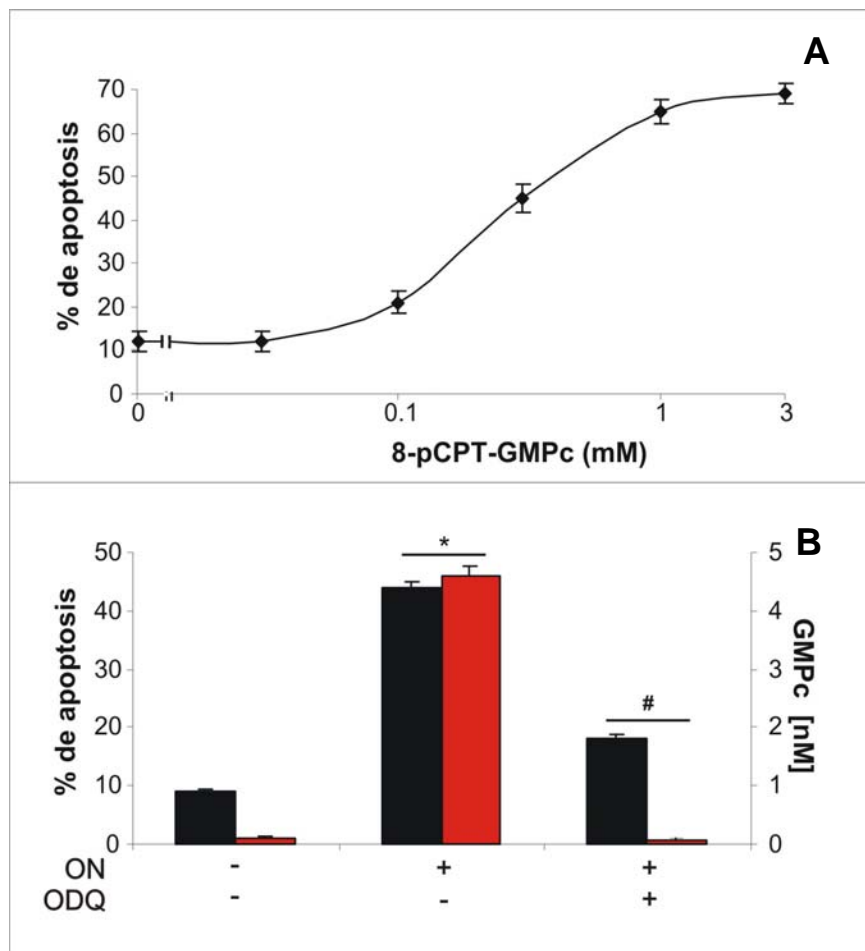


Figura 25. Rol del GMPc en la apoptosis de MCs inducida por ON. **A)** Los MCs fueron incubados con 8-pCPT-GMPc y luego de 24 horas se evaluó la apoptosis por citometría de flujo ($n = 3$). **B)** El ODQ (0,5 μ M) se agregó 30 minutos antes que el PAPA/ON (125 mM). El porcentaje de apoptosis (barras rojas) se determinó a las 24 horas y el GMPc acetilado se midió en los lisados celulares luego de 15 minutos de estimulación con ON ($n = 5$ en duplicado). * $p < 0,05$ vs control. # $p < 0,05$ vs PAPA/ON.

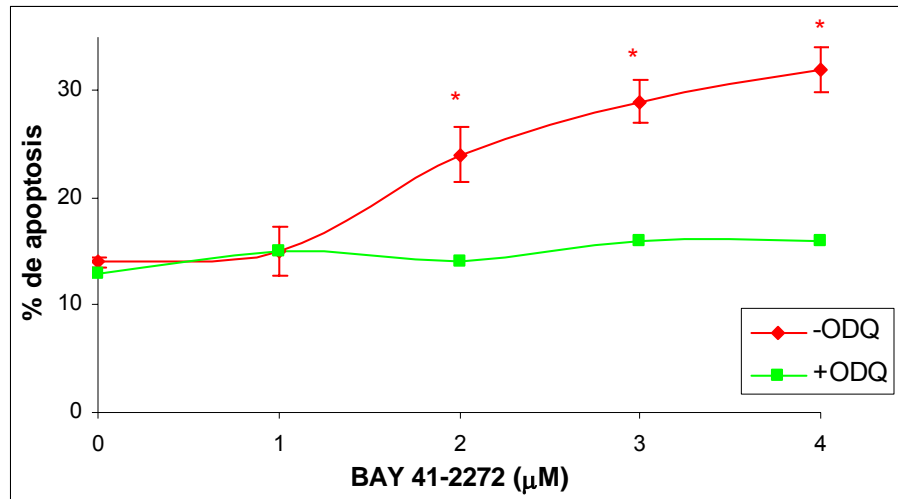


Figura 26. Efecto de la activación directa de la guanilato ciclasa sobre la apoptosis de MCs inducida por ON. Los MCs fueron incubados con diferentes concentraciones de BAY 41-2272. El ODQ (0,5 mM) fue agregado 30 minutos antes que el BAY 41-2272 (n=3 en duplicados). * p<0,05 vs sin BAY 41-2272 (control).

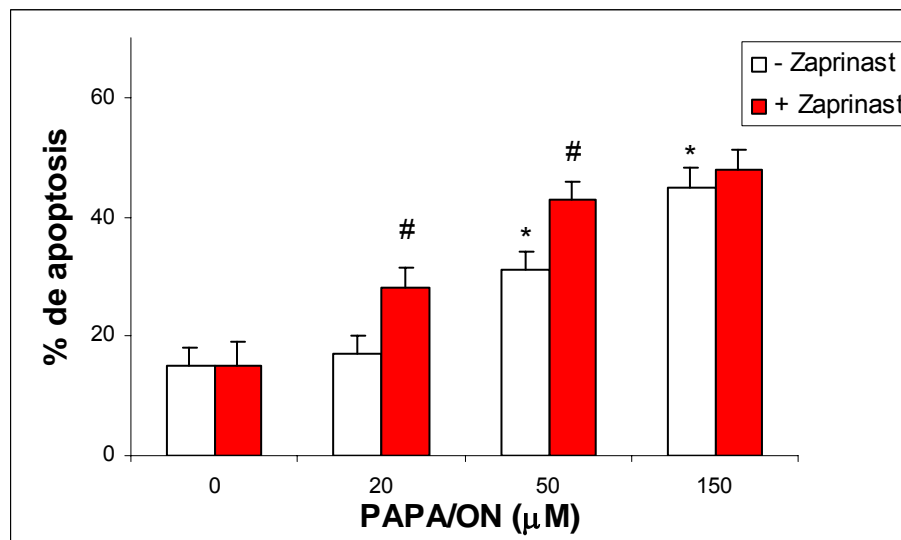


Figura 27. Efecto de la inhibición de la PDE V sobre la apoptosis de MCs inducida por ON. Los MCs fueron incubados con diferentes concentraciones de PAPA/ON en presencia (barras blancas) o ausencia (barras rojas) de Zaprinas (40 mM) y luego de 24 horas se evaluó la apoptosis por citometría de flujo (n=5). *p<0,05 vs sin PAPA/ON (control), #p<0,05 vs igual concentración de PAPA/ON sin Zaprinas.

4.11.2. Activación de caspasa-3

Las caspasas son las enzimas ejecutoras de la muerte celular programada. Considerando que recientemente fue reportado un aumento en los niveles de caspasa-3 activada en MCs senescentes y apoptóticos [182] se estudió si la activación de esta enzima formaba parte del mecanismo molecular involucrado en este modelo de muerte celular inducida por ON. En la Figura 28 se puede observar que la estimulación con ON dio como resultado un aumento del porcentaje de MCs que expresaban caspasa-3 en su forma activada, mostrando su valor máximo luego de 5 horas (control: $4,0 \pm 0,5$; ON: $18,4 \pm 1,0\%$ de células positivas; n=3 por duplicado; $p < 0,05$).

Estudios recientes han demostrado que la detección inmunológica del fragmento activo de la caspasa-3 puede no traducirse en un aumento de su función enzimática debido a la presencia de proteínas inhibidoras del sitio activo [183]. Por lo tanto, a continuación se realizaron ensayos para cuantificar su actividad. Los MCs tratados con ON mostraron un aumento (mayor de 4 veces) en la actividad de esta enzima respecto de los MCs control (Figura 29) confirmando la funcionalidad de esta enzima detectada por citometría de flujo.

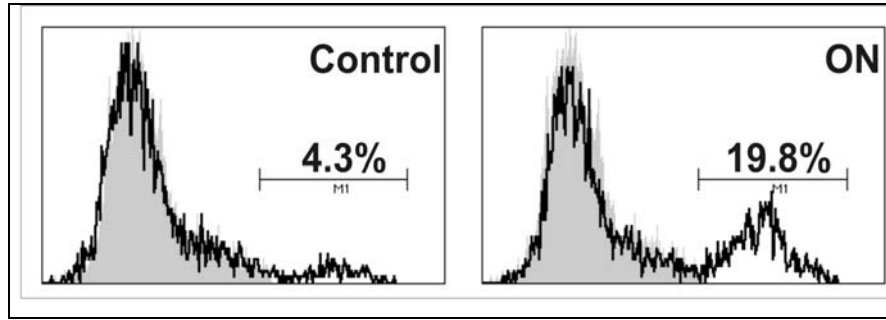


Figura 29. Expresión del fragmento activo de caspasa-3. Los MCs fueron incubados 5 horas con PAPA/ON (125 μ M). Los niveles de caspasa-3 activada fueron determinados por citometría de flujo. Los histogramas muestran células marcadas con el Ac. control de isotipo (área gris) o el anti-fragmento de caspasa-3 activada (línea negra) y representan 1 de 3 experimentos similares realizados por duplicado.

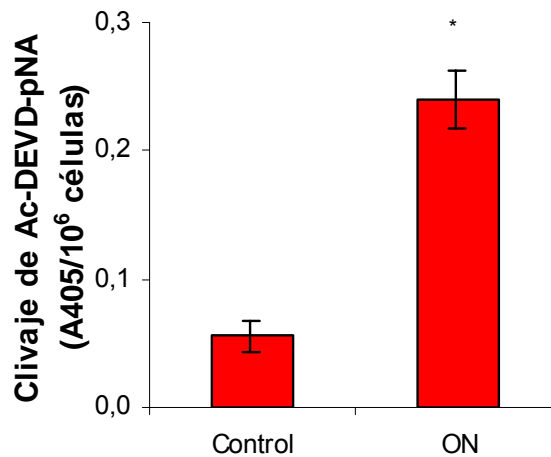


Figura 29. Actividad enzimática de la caspasa-3. Los MCs fueron incubados 5 horas con PAPA/ON (125 μ M). La actividad cisteíno-proteasa fue determinada por el clivaje de su sustrato Ac-DEVD-pNA y posterior detección colorimétrica del producto pNA. Los valores representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes y se expresan en unidades de absorbancia a 405 nm por cada millón de células utilizadas (A405/10⁶ células). * $p < 0,05$ vs control.

4.11.3. Regulación de Bcl-xL

En el año 2001, Sanz y colab. reportaron que la proteína antiapoptótica Bcl-xL presenta un patrón diferencial de expresión a lo largo de la diferenciación de MCs aumentando a medida que el MC madura y disminuyendo hasta desaparecer durante su senescencia [184].

En un trabajo posterior fue demostrada la importancia de esta proteína en el mecanismo de supervivencia celular mediado por TPO [185]. Teniendo en cuenta estos hallazgos examinamos si el mecanismo proapoptótico del ON era mediado por una regulación negativa de Bcl-xL. Contrariamente a lo esperado, la expresión de esta proteína fue regulada positivamente por el tratamiento de MCs con PAPA/ON durante 5 horas (Figura 30).

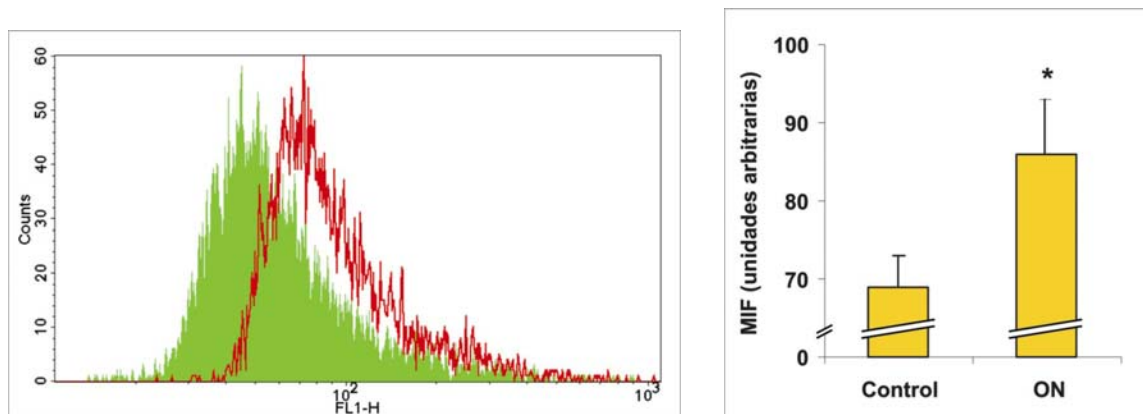


Figura 30. Modulación de la expresión de Bcl-xL por ON. Los MCs fueron incubados 5 horas con PAPA/ON (125 μ M). Los niveles de Bcl-xL fueron determinados por citometría de flujo (izquierda). Los histogramas muestran células marcadas con el control de isotipo (área verde) o Bcl-xL (línea roja) y representan 1 de 6 experimentos similares. Las barras (derecha) representan la media \pm EE de la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) de los 6 experimentos. * $p < 0,05$.

4.12. La TPO previene la apoptosis de MCs inducida por ON

Diversos estudios hallaron que la TPO promueve la supervivencia de células CD34⁺ y megacarioblastos [186]. En nuestros ensayos la inducción de apoptosis se realizó el día 12 de cultivo agregando ON en el mismo medio (IMDM suplementado con suero humano (5 %) y TPO (25 ng/ml) al inicio y 6 días después). La posibilidad de inducir apoptosis indicaba la ausencia de protección por parte de la TPO lo cual podía haber ocurrido por endocitosis como consecuencia de la interacción ligando-receptor [187] o por pérdida de su actividad. Para analizar esta última hipótesis se incubó IMDM conteniendo TPO (25 ng/ml) durante 6 días a 37°C. Luego se resuspendieron células CD34⁺ en este medio y se agregó suero fresco. Al cabo de 4 días, la determinación de apoptosis (55% n=3) y el recuento de células (5 veces menos que el recuento original) determinó la muerte del mismo señalando que estas condiciones experimentales inducen la pérdida de la actividad de la TPO.

Con el fin de evaluar la prevención de muerte por esta citoquina en los siguientes experimentos se adicionó TPO previamente a la exposición con ON. Los resultados mostraron que su presencia indujo una marcada inhibición de la apoptosis en forma concentración dependiente (Figura 31). Sin embargo, esta protección se observó solamente cuando la TPO fue agregada hasta 5 horas antes que el ON. Luego de 24 horas del agregado de TPO, el ON indujo una apoptosis de similar magnitud que en ausencia de la misma (Tabla 4).

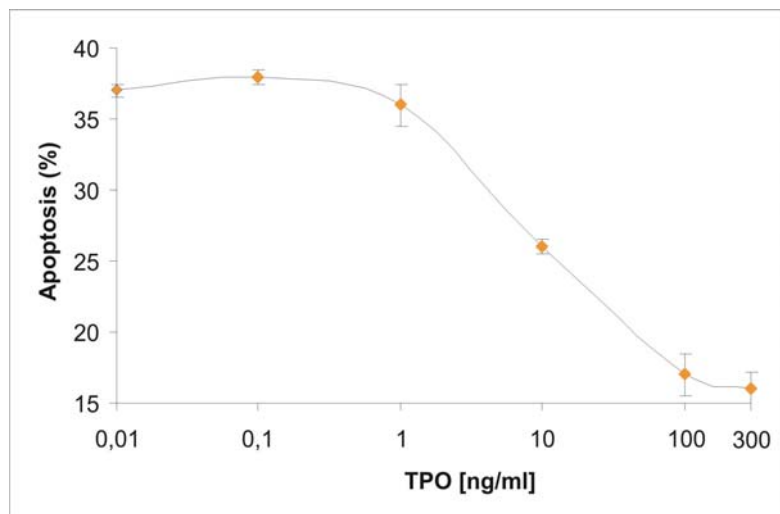


Figura 31. Prevención por TPO de la apoptosis de MCs inducida por ON. Los MCs fueron incubados 1 minuto con diferentes concentraciones de TPO y luego se agregó el PAPA/ON (125 μ M). Al cabo de 24 horas la apoptosis fue evaluada por citometría de flujo (n=3).

Tabla 4. Efecto de la TPO sobre la apoptosis inducida por ON.

Tratamiento	Apoptosis (%)
Control	11 \pm 2
TPO	7 \pm 1
PAPA/ON	46 \pm 2*
TPO 1 minuto+PAPA/ON	16 \pm 1 [#]
TPO 1 hora+PAPA/ON	16 \pm 1 [#]
TPO 5 horas+PAPA/ON	25 \pm 1 [#]
TPO 24 horas+PAPA/ON	46 \pm 1*

Las células fueron tratadas con TPO (100 ng/ml) y luego de los tiempos indicados fue agregado el PAPA/ON (125 μ M). La apoptosis fue evaluada 24 horas después por citometría de flujo (n=3). * $p < 0,05$ vs control. [#] $p < 0,05$ vs PAPA/ON.

4.13. Efecto del ON en otras etapas de la MCp

4.13.1. Rol del ON en la formación de proplaquetas y plaquetas en cultivo

La apoptosis de MCs y la formación de plaquetas son eventos temporalmente relacionados aunque la vinculación funcional entre ambos fenómenos aún no ha sido esclarecida [182, 188]. Se ha postulado que el ON es el mediador involucrado en la formación de plaquetas en la línea megacariocítica Meg-01 [178]. Para evaluar si esto también ocurría en MCs primarios, se evaluó el efecto del PAPA/ON sobre esta última etapa de la MCp. Uno de los parámetros evaluados fue la aparición de MCs formadores de proplaquetas que en nuestras condiciones se observó a partir del día 9-10 de cultivo en la mayoría de los ensayos y fue aumentando progresivamente hasta el día 12-14 (datos no mostrados). Los cultivos expuestos durante 24 horas al ON mostraron una leve disminución (no significativa) del porcentaje de estas células (Figura 32).

Para estudiar el efecto del ON sobre la formación de plaquetas utilizamos muestras de diferentes estadios de diferenciación (días 8 y 14 de cultivo). Si bien las muestras menos diferenciadas (día 8) mostraron un aumento del número de plaquetas como consecuencia del tratamiento con ON y en cambio, las más diferenciadas mostraron el resultado opuesto, ambos valores no fueron significativamente diferentes de los valores control (Figura 34).

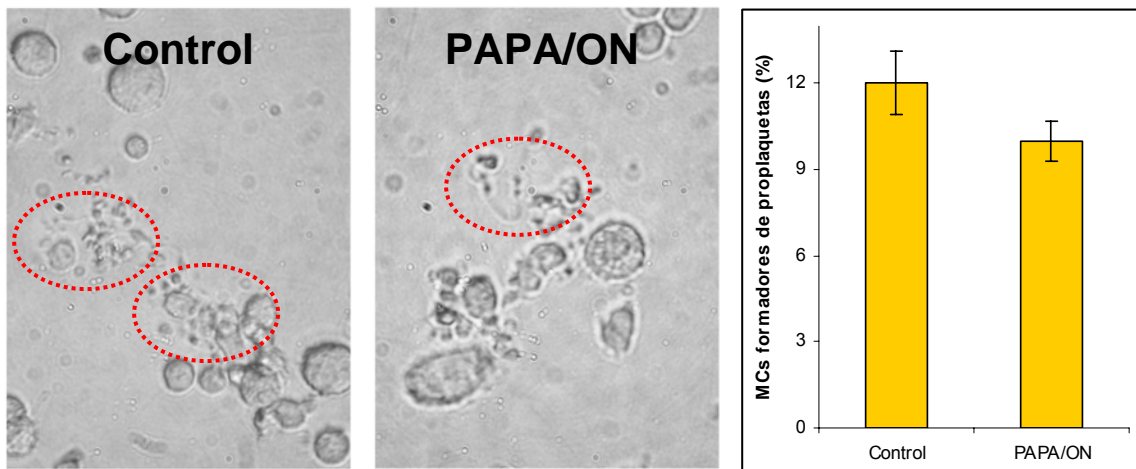


Figura 32. Cuantificación de MCs productores de proplaquetas. Los MCs (día 11 de cultivo) fueron tratados durante 24 horas con PAPA/ON (125 μ M). Los MCs productores de proplaquetas (señalados línea punteada roja) fueron cuantificados utilizando un microscopio invertido con contraste de fase (izquierda) y se contaron 500 células por experimento. Los gráficos de barra (derecha) muestran la media \pm EE de 4 experimentos. No se obtuvieron diferencias significativas entre control y PAPA/ON.

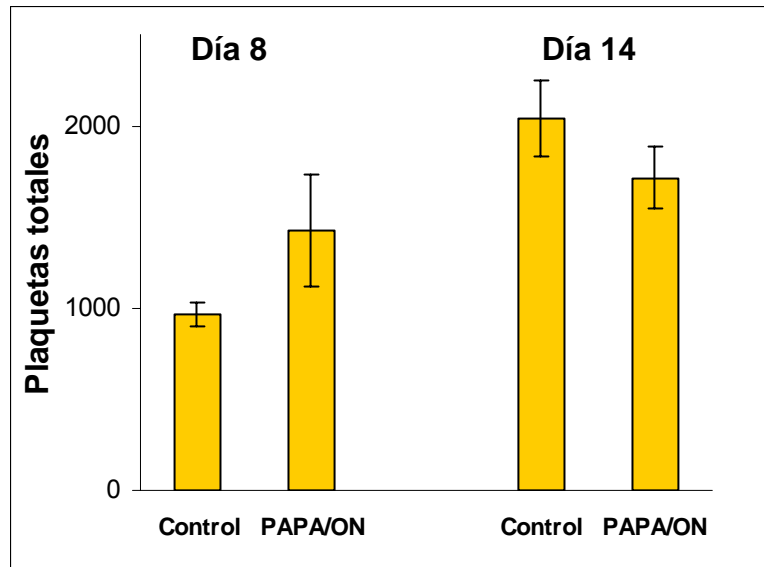
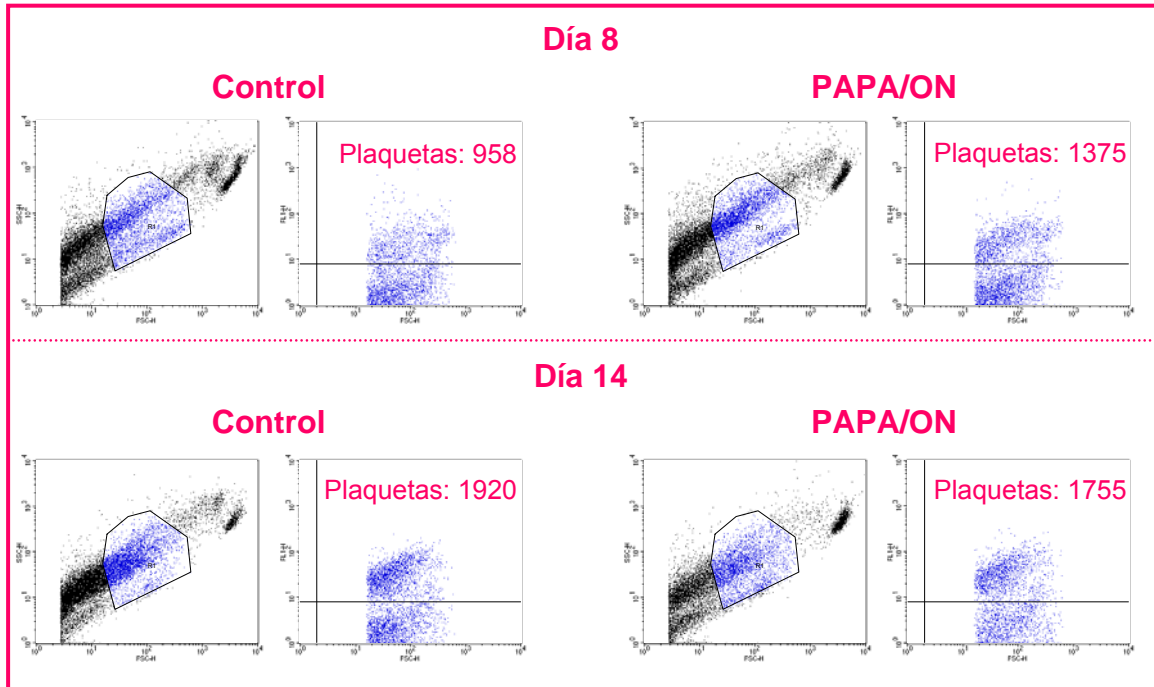


Figura 34. *El ON no modifica la formación de plaquetas en cultivo.* El PAPA/ON (125 μ M) se agregó en los días 8 o 14 de cultivo y 24 horas después se determinó la cantidad de plaquetas por citometría de flujo. Los gráficos de puntos del recuadro superior muestran el análisis de una muestra representativa. El gráfico inferior representa la media \pm EE de 4 experimentos y los resultados se expresan en unidades arbitrarias.

4.13.2. Inhibición de la adhesión de MCs a células endoteliales por ON

La MCp es regulada tanto por factores solubles como por la interacción célula-célula en el entorno medular [164-166, 189]. En este sentido, la interacción entre MCs y células endoteliales (CE) tiene un rol relevante en la etapa final de este proceso promoviendo la sobrevivencia del MC y permitiendo la formación de plaquetas [177, 190]. Considerando que el endotelio vascular es una fuente importante de ON evaluamos su rol en el proceso de adhesión MCs/CEs utilizando HUVECs (CEs derivadas de cordón umbilical humano). La inhibición de la síntesis endógena de ON por el tratamiento de CE con L-NAME previamente al agregado de los MCs no mostro diferencias significativas en la adhesión de los MCs con respecto a las células no tratadas (28 ± 3 , 32 ± 1 y 33 ± 3 % de adhesión para 0, 100 y 500 μ M de L-NAME respectivamente, n = 3).

En forma contraria, el pretratamiento de MCs durante 15 minutos con diferentes concentraciones de NPS disminuyó la adhesión con respecto a las células control (Tabla 5). Para analizar si el efecto del NPS estaba asociado a su acción citotóxica evaluamos la viabilidad de los MCs luego de la incubación con NPS y encontramos que la fracción de células viables fue similar a aquella observada en los controles (mayor del 90 %) utilizando dos tinciones diferentes (azul de trypan o la mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio, n=3).

Se ha demostrado que las plaquetas pueden unirse al endotelio activado a través de la interacción entre la P-selectina endotelial y la GPIb en la superficie plaquetaria [191]. En los siguientes experimentos analizamos si la menor adhesión de los MCs expuestos al ON también se observaba en CE estimuladas.

La estimulación con TNF- α aumentó en forma significativa la cantidad de MCs adheridos a la monocapa de CE mientras que la preincubación de los mismos con NPS previno parcialmente esta interacción (Tabla 5).

TABLA 5. Efecto del NPS en la adhesión de MCs a CE.

NPS (μ M)	Adhesión (%)	
	CE en reposo	CE estimuladas
0	28 \pm 3	75 \pm 3
50	21 \pm 1*	No determinado
100	17 \pm 2*	62 \pm 4*
200	13 \pm 1*	59 \pm 5*

Los MCs (marcados con ^{51}Cr) fueron incubados durante 15 minutos con diferentes concentraciones de NPS y luego de lavados fueron colocados sobre monocapas confluentes de CE en reposo e incubados durante 1 hora. Por otra parte, las CE fueron preincubadas con TNF- α durante 4 horas y luego de lavar los MCs (marcados con ^{51}Cr y preincubados durante 15 minutos con diferentes concentraciones de NPS) fueron colocados sobre las monocapas e incubados durante 1 hora. Luego de lavar, los MCs adheridos fueron cuantificados por su emisión γ en un contador de centelleo líquido (n=4). * P<0,05 vs sin NPS.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se ha estudiado el papel del ON sobre la MCp y los resultados obtenidos muestran que la generación de MCs, derivados de CMN o de células CD34⁺, es inhibida por el ON *per se*, ya que fue independiente del tipo de dador de ON utilizado. Ciertamente, los efectos asociados al uso de dadores de ON pueden estar relacionados no solamente con el ON sino también con la molécula transportadora o con los subproductos generados como consecuencia de su metabolismo. Sin embargo, el efecto supresor de los dadores no se relacionó con la molécula transportadora del DETA/ON ni con la formación de nitritos o cianuro ya que ninguna de esas drogas afectó la generación de MCs.

El efecto supresor del ON se observó cuando la generación de MCs fue inducida tanto por TPO como por IL-3 sugiriendo que su acción no se relacionaría con una interferencia en las vías de transducción de señales ejercidas por la TPO sino más bien con un efecto generalizado del ON sobre la muerte celular. El ON suprimió el crecimiento de MCs a partir de una población de CMN o de células CD34⁺ indicando un efecto citotóxico directo en precursores hematopoyéticos. El hallazgo de que las células CD34⁺ fueron más sensibles que las CMN al efecto inhibitorio del ON sugiere que las células no hematopoyéticas podrían liberar mediadores con funciones citoprotectoras contrarrestando los efectos antiproliferativos del ON.

Un trabajo previo utilizando cultivos semisólidos tanto de CMN como de células CD34⁺ de médula ósea, reportó efectos antagónicos en la formación de colonias por la exposición a dos dadores de ON: NPS o S-nitroso-N-

acetilpenicilamina (SNAP) [128]. En el caso de CMN, ambos dadores disminuyeron significativamente la formación de colonias mieloides y eritroides. En cambio, en células CD34⁺, mientras el SNAP reprodujo el efecto inhibitorio, el NPS presentó un efecto diferencial ya que inhibió la formación de colonias eritroides pero estimuló la generación de mieloides. En los experimentos aquí presentados, aún cuando se utilizó un rango de concentraciones similares, no se observaron respuestas diferentes respecto de los dadores de ON con el tipo celular utilizado. Esta discrepancia podría ser explicada por el hecho que los mencionados autores utilizaron una técnica de cultivo diferente y un medio condicionado de leucocitos que no incluía TPO.

Teniendo en cuenta que *in vivo*, a nivel de médula ósea, el ON puede ser generado de manera constitutiva o inducida dependiendo del tipo celular que lo produzca [126, 192] cabía estudiar si los efectos observados con dadores de ON también eran reproducidos por su generación endógena. Cuando la síntesis de ON fue gatillada por una mezcla de sustancias proinflamatorias (TNF- α + IFN- γ), tanto en CMN como en CD34⁺, se observó una disminución en la producción de MCs. Es interesante el hecho que los inhibidores de las NOS, luego de suprimir el aumento en los niveles de ON, revirtieran sólo de manera parcial la inhibición del crecimiento de MCs ya que sugiere que existirían otros mecanismos involucrados en este efecto. En este sentido, es razonable suponer que la acción antiproliferativa de esta mezcla de citoquinas resulte de la conjunción de varios mecanismos ya que, por ejemplo, es conocido que el TNF- α es capaz de desencadenar la vía extrínseca de activación del proceso apoptótico [149].

El efecto del ON en el crecimiento celular cuando es liberado por sustancias proinflamatorias ha sido estudiada previamente por otros grupos [126, 131]. En concordancia con los resultados aquí presentados, Maciejewski y col. [126] demostraron en CMN y células CD34⁺ derivadas de médula ósea humana que luego del tratamiento con INF- γ y TNF- α se observa un marcado aumento en la expresión de iNOS y una inhibición en el desarrollo de colonias eritroides o mieloides que es parcialmente revertida por el uso de inhibidores de las NOS. En cambio, otros autores observaron que la acción antiproliferativa de citoquinas es mediada totalmente por ON, discordancia que podría explicarse por haber utilizado células murinas en lugar de humanas [131].

En conjunto, estos datos sugieren que la expresión de iNOS y la consecuente producción de ON en una escala más elevada que cuando es producido por NOS constitutivas, podría ser citotóxica no solo de forma autócrina sino también parácrina. Los resultados aquí obtenidos muestran que el número de MCs derivados de células CD34⁺ disminuye por el agregado exógeno de la molécula precursora de ON, L-arginina. Más aún, el uso de L-NAME, inhibidor competitivo no específico de la síntesis de ON, previene este efecto mientras el pretratamiento de células CD34⁺ con L-NAME aumenta la producción de MCs. Si bien estos resultados sugieren que los precursores hematopoyéticos también producirían niveles basales de ON, se requieren de experimentos adicionales para confirmar la presencia de una NOS constitutiva en estas células.

Se ha demostrado que los precursores indiferenciados poseen una alta sensibilidad al ON, lo cual explicaría el efecto supresor del mismo en la formación

de colonias de distintos linajes [126]. Sin embargo, el efecto del ON en progenitores comisionados es poco conocido. Para estudiar este punto, se analizó el efecto del agregado del ON en células obtenidas en diferentes días de cultivo post-estimulación de células CD34⁺ con TPO. La exposición al ON durante la fase proliferativa que ocurre durante los primeros 7 días provocó la muerte de las células en cultivo indicando que los progenitores comisionados al linaje megacariocítico también son sensibles al ON. Más aún, el ON en MCs maduros disminuyó significativamente la viabilidad celular confirmando que el efecto citotóxico no está relacionado con un estadio específico de la MCp, sino que es un fenómeno generalizado de activación y/o inhibición de los mecanismos de muerte y/o sobrevida respectivamente.

En los resultados aquí obtenidos, tanto la evaluación microscópica como la citometría de flujo, demostraron que los efectos del ON están asociados a la inducción de muerte celular programada y que la misma es más marcada en células maduras que en precursores indiferenciados. Restaría aclarar entonces a través de cuál mecanismo, el ON ejerce el efecto proapoptótico sobre los MCs.

Con este objetivo y considerando que el GMPc es el principal mediador de los efectos biológicos del ON [102], se estudió el papel de este nucleótido en la apoptosis de MCs. Se observó que el análogo permeable 8-Br-GMPc no fue capaz de inducir muerte celular sugiriendo que el efecto proapoptótico del ON era independiente del GMPc. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, otros autores demostraron que el ON induce apoptosis y formación de plaquetas en células de la línea megacariocítica Meg-01 de manera dependiente

e independiente del GMPc, respectivamente [178]. Frente a esta controversia, se decidió profundizar estos estudios utilizando otro análogo y fármacos reguladores de su síntesis intracelular.

La exposición de MCs a un análogo más lipofílico y por lo tanto más permeable como el 8-pCPT-GMPc dio como resultado un aumento significativo de la apoptosis de MCs. Una posible explicación para esta diferencia de efectos entre ambos análogos podría radicar no sólo en la diferente lipofilicidad sino también en la susceptibilidad a su hidrólisis por fosfodiesterasas [193]. De hecho otros autores observaron que la inhibición de la activación plaquetaria por 8-Br-GMPc sólo ocurre en una concentración 3 órdenes de magnitud superior a la requerida por el 8-pCPT-GMPc [194].

Por otro lado, la activación directa de la guanilato ciclasa con BAY 41-2272 también gatilló la muerte celular programada de los MCs mientras que el zaprinast, un inhibidor de la fosfodiesterasa específica del GMPc, potenció el efecto proapoptótico del PAPA/ON. Más aún, la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ disminuyó parcial pero significativamente la apoptosis de MCs mediada por PAPA/ON y completamente la inducida por BAY 41-2272.

Conjuntamente, estos resultados indicarían que el aumento en los niveles de GMPc participaría en la apoptosis de MCs mediada por PAPA/ON. Sin embargo, dado que la muerte inducida por este dador de ON no fue suprimida completamente por ODQ no puede excluirse la posibilidad de que la generación de otras especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido y el peroxinitrito también participen como efectores de la respuesta citotóxica del ON sobre MCs.

En este sentido, es interesante destacar que utilizando células de la línea Meg-01 tratadas con ON, Battinelli y Loscalzo [195] inicialmente postularon que el peroxinitrito era el responsable de la apoptosis, pero en un estudio posterior le adjudicaron el papel principal al GMPc [178]. La participación de este nucleótido cíclico en la apoptosis mediada por ON en otros tipos celulares también es controversial. En concordancia con los datos aquí presentados, otros grupos de estudio reportaron que el GMPc induce apoptosis en diversos tipos celulares, incluyendo células musculares lisas, endoteliales, pancreáticas y cardiomiocitos [196-199]. En contraste, ha sido postulado que el GMPc generado por la nNOS es esencial para la supervivencia de neuronas [200, 201]. Más aún, en macrófagos, el GMPc activa la PKG y paradójicamente es capaz de proteger la apoptosis inducida por ON previniendo la liberación de citocromo-c mitocondrial y la activación de caspasas [202, 203]. Es evidente que el papel del GMPc como inductor o protector de la muerte celular programada aún no está del todo aclarado y que los efectos del mismo parecerían estar asociados al tipo celular, a la concentración de donadores de ON, al tipo de análogo de GMPc y al modelo experimental utilizado.

Para profundizar los mecanismos apoptóticos *downstream* del ON/GMPc analizamos tanto la expresión de un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 con conocida actividad antiapoptótica como Bcl-xL, como la activación de caspasa-3. En MCs, Bcl-xL ha adquirido relevancia dentro de los mecanismos que regulan la decisión de supervivencia/muerte de MCs ya que presenta un patrón de expresión diferencial a lo largo de la MCp [184]. Mientras que en líneas celulares (que

expresan el c-Mpl) se demostró un aumento en la expresión de esta proteína como uno de los mecanismos de sobrevida celular gatillados por la TPO [185], en otros tipos celulares, ha sido descrito que la disminución de la expresión de Bcl-xL juega un papel central en la inducción de apoptosis [204] y durante el proceso de *anoikis* o muerte inducida por la pérdida de la interacción células-matriz extracelular [205]. Fue entonces que resultó sorprendente encontrar en nuestros estudios un aumento en la expresión de Bcl-xL inducida por ON. Sin embargo, podría ocurrir que este incremento represente una respuesta de sobrevida que es superada por una expresión aún mayor de proteínas proapoptóticas como Bad o Bax. De hecho, un mecanismo similar ha sido propuesto para explicar los aumentos concomitantes de miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 observados en biopsias de miocardios de pacientes con cardiomiopatía dilatada o enfermedad coronaria isquémica [206].

Los ejecutores centrales del proceso apoptótico son las proteasas de la familia de las caspasas. En MCs expandidos *in vitro*, las caspasas-3 y 9 se activan durante la fase terminal de su maduración [182]. En concordancia, aquí se muestra en MCs maduros el aumento del fragmento activo de caspasa-3 como consecuencia de la apoptosis inducida por ON. La detección de la forma activa (clivada) de la caspasa-3 no necesariamente se traduce en muerte celular ya que el sitio activo de este fragmento puede ser inhibido por la unión de proteínas citoplasmáticas inhibitoras de la apoptosis (IAPs) [207] o por S-nitrosilación, como se demostró en la apoptosis de células Meg-01 inducida por ON [195]. En nuestros estudios, además de la expresión del fragmento activo antes

mencionado, la exposición de MCs al PAPA/ON indujo un marcado incremento de la actividad enzimática de esta cisteíno-proteasa confirmando la participación de caspasa-3 en la muerte celular programada mediada por ON.

En los últimos años, algunos trabajos han mostrado que la apoptosis del MC y la formación de plaquetas serían eventos temporalmente relacionados [208]. Sin embargo, existen controversias respecto a si la formación de plaquetas precede [182] o es consecuencia de la muerte de MC [188]. Por otro lado, las bases moleculares de ambos procesos aún no están claramente establecidas. Entre los mecanismos involucrados, De Botton y col. [182] demostraron que la formación de proplaquetas ocurre en el MC maduro como consecuencia de la activación inicialmente localizada de caspasa-3 que, luego en el MC apoptótico, se torna generalizada y se acompaña con la permeabilización de la membrana mitocondrial y expresión de fosfatidilserina. El factor de transcripción NF-E2 también sería un elemento clave aunque se desconoce el mecanismo de activación del mismo durante la producción de plaquetas [209, 210]. Respecto a las señales extracelulares que regulan la generación de plaquetas existen evidencias demostrando que si bien la TPO es crítica para el desarrollo del MC, la misma no participaría en la trombopoyesis [211]. Recientemente, Battinelli y col. [178] describieron que el ON induce la formación de plaquetas en células Meg-01. Para extender estos hallazgos a células primarias, en nuestros experimentos se expusieron MCs maduros a PAPA/ON. En contraste con las observaciones de Battinelli y col. [178] se observó que tanto la aparición de proplaquetas como la formación de plaquetas en el medio de cultivo no fueron modificadas

significativamente por la presencia de ON. Una explicación para estas diferencias sería el uso de líneas celulares vs. MCs primarios.

En forma similar a otros factores de crecimiento, la TPO no sólo promueve el crecimiento sino también la supervivencia celular previniendo su muerte [186]. En nuestros estudios la capacidad del ON de gatillar apoptosis en un medio que había sido suplementado con TPO cuestionaba este efecto. Dado que la interacción del c-Mpl con su ligando resulta en el secuestro y degradación del complejo ligando-receptor [187] cabía la posibilidad que la concentración de TPO en nuestro medio de cultivo fuera insuficiente o nula en el momento de la inducción de apoptosis y/o que la TPO remanente no estuviera activa. Aunque no se cuantificaron los niveles de TPO en el medio, la muerte de células CD34⁺ que fueron cultivadas con un medio suplementado con TPO previamente incubado durante 6 días a 37°C sugiere que esas condiciones producen una disminución de la actividad de este factor de crecimiento. Sin embargo, el agregado de TPO previo a la exposición de los MCs al ON previno marcadamente la muerte celular confirmando su actividad antiapoptótica. Por otro lado, este efecto protector de la TPO no se obtuvo cuando la misma fue agregada 24 horas antes indicando que el mismo sería un fenómeno agudo característica de la actividad antiapoptótica de la TPO no descrita hasta el momento.

Estos datos en conjunto indican que el ON regula negativamente el crecimiento de los MCs y que la TPO previene este efecto. Los niveles de ON en el organismo son el resultado de la acción de las tres isoformas enzimáticas. La eNOS y la nNOS generan concentraciones relativamente bajas de ON que

regulan procesos fisiológicos en el sistema cardiovascular y nervioso, respectivamente. Altas concentraciones de ON, asociadas con funciones citotóxicas y citostáticas se producen a través de la iNOS, isoforma inducida principalmente por moléculas proinflamatorias [138]. Considerando que la acción citotóxica del ON en nuestros estudios fue ejercida no solamente en MCs maduros sino también en progenitores megacariocíticos, de ocurrir esta situación *in vivo*, el resultado final de la acción del ON sobre la MCp sería una trombocitopenia, hecho de difícil interpretación fisiológica. Además, cabe destacar que la inducción de apoptosis por ON, tanto en nuestros estudios como en otros, requiere de concentraciones mayores que aquellas necesarias para inhibir la activación de plaquetas o regular el tono vascular, principales actividades fisiológicas que ejerce el ON en el sistema cardiovascular. De esta manera, se podría especular que la muerte celular programada de progenitores megacariocíticos mediada por ON podría estar involucrada en la patogenia de algunas trombocitopenias.

Sin embargo, es importante señalar que dos trabajos independientes realizados en ratones normales y no relacionados con la producción de plaquetas, mostraron como hallazgos secundarios que la administración sistémica de inhibidores de las NOS da como resultado una disminución en el recuento plaquetario [212, 213]. Más recientemente, en ratones genéticamente deficientes en iNOS, se observó un recuento plaquetario significativamente menor que los ratones normales mientras que aquellos deficientes en eNOS no mostraban diferencias [178]. Estos hallazgos llevaron a los autores a postular que el ON

producido por la iNOS es el mediador responsable de la trombopoyesis, o formación de plaquetas, y que el mecanismo involucrado sería la inducción de apoptosis en MCs maduros [178]. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis restaría demostrar que la trombocitopenia observada en los ratones deficientes en NOS no es consecuencia de una mayor agregación y consumo de plaquetas o de una adhesión aumentada de plaquetas al endotelio debido a una mayor trombogenicidad de las células endoteliales por la falta de ON. También se debería analizar si la disminución en el recuento de plaquetas está asociada a un aumento en médula de MCs que sufrieron el proceso de maduración citoplasmática (formación de sistema de demarcación de membrana) sin liberar plaquetas [211].

Dado que el sinusoide es una fuente importante de ON en el microambiente hematopoyético, recientemente hemos evaluado su implicancia en la interacción MCs/HUVECs. Los datos preliminares obtenidos mostraron que la inhibición farmacológica de la síntesis de ON endotelial no produjo cambios significativos con respecto a la adhesión de los MCs en células no tratadas. Si bien estos resultados sugieren que el ON producido por el endotelio no modularía la adhesión de MCs, es importante considerar la posibilidad de que las concentraciones producidas en el modelo experimental utilizado pueden no ser suficientes para regular este proceso. De hecho, el pretratamiento de MCs con dadores de ON suprimió, moderada pero significativamente, su adhesión tanto a CEs en reposo como a aquellas activadas con una citoquina proinflamatoria como el TNF- α . Si bien existe un consenso generalizado sobre la capacidad del ON de

inhibir la adhesión de las plaquetas al endotelio, resulta llamativa la escasa cantidad de evidencias publicadas [214, 215]. Nuestras observaciones indicarían que la misma regulación existiría en MCs.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo de Tesis demuestran que:

- El ON tanto exógeno como endógeno suprime la proliferación de MCs maduros y de sus progenitores a través de la inducción de muerte celular programada mediada por aumentos del GMPc y activación de caspasa-3.
- La TPO previene el efecto proapoptótico del ON en MCs maduros.
- El ON exógeno inhibe la adhesión de MCs a células endoteliales.

PERSPECTIVAS.

En el curso de este trabajo de Tesis, si bien resultó evidente el importante papel que el ON tiene en la regulación de la MCp, surgieron diferentes interrogantes, algunos de los cuales son materia de estudio actualmente en nuestro laboratorio.

Por ejemplo, ¿podría el ON actuar fisiológicamente de manera selectiva sobre MCs maduros produciendo apoptosis y generando plaquetas y no sobre células indiferenciadas o progenitores? La respuesta es que podría ser factible ya que los progenitores megacariocíticos ocupan el nicho osteoclástico mientras los MCs maduros residen en el nicho vascular en íntimo contacto con sinusoides endoteliales [216]. Al ocupar diferentes microambientes, es posible que diferentes factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión, regulen la acción del ON en cada nicho.

Otra pregunta que surgió es ¿cómo la iNOS regularía fisiológicamente la producción de plaquetas dado que su expresión está asociada a procesos patológicos? En este contexto cabe aclarar que hoy se acepta que la expresión de iNOS no siempre es inducida y que una expresión constitutiva pero moderada de esta enzima en el lecho vascular medular podría ser la responsable de la trombopoyesis. Ciertamente, han sido detectados bajos niveles de expresión basal de esta enzima en médula ósea aunque su funcionalidad y localización no fue aclarada [126, 192]. Además, se ha descrito que las células endoteliales de la médula ósea poseen un fenotipo funcional diferente al de otros lechos vasculares [177]. La presencia de iNOS en los sinusoides de la médula también

estaría en concordancia con la hipótesis de una acción selectiva del ON en células maduras.

También es importante considerar que mientras el ON constitutivamente liberado por el endotelio encuentra hacia el lumen un tejido fluido, en el espacio medular, que es estacionario, se favorecería la acumulación de mayores concentraciones de ON periendoteliales y de este modo el ON generado por la eNOS podría cumplir con funciones diferentes a las conocidas en el torrente sanguíneo.

Por este motivo y para comprender con mayor precisión el papel del ON en el espacio medular, planeamos explorar el papel de otras moléculas del microambiente vascular como la prostaciclina, el factor derivado del estroma-1 (SDF-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGF-4) y extender los estudios con células endoteliales derivadas de médula ósea, así como en modelos *in vivo*.

**PUBLICACIONES PARCIALES DEL
TRABAJO REALIZADO Y
REUNIDO DURANTE ESTA TESIS**

Effect of nitric oxide on megakaryocyte growth induced by thrombopoietin.

Schattner M, **Pozner RG**, Engelberger I, Gorostizaga A, Maugeri N, Gomez R, Pasqualini A, Torres O, Lazzari MA.

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 2001; 137: 261-269.

Este trabajo mereció el comentario editorial de la revista: **Nitric oxide and cell survival: Megakaryocytes say "NO"**. Selleri C, Maciejewski JP (Pags. 225-31).

Prostacyclin prevents nitric oxide-induced megakaryocyte apoptosis.

Pozner RG*, Negrotto S*, D'Atri LP, Gomez RM; Kottler M, Lazzari MA, Schattner M. * **Ambos autores contribuyeron de igual manera en el trabajo.**

British Journal of Pharmacology, Junio 2005; 145 (3): 283-92.

Este trabajo mereció el comentario editorial de la revista: **Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals**. Gordge, MP (Pags. 271-3).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Hershock, and A. M. Gewirtz, Megakaryocytopoiesis, in Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, in Collman, R. W., Hirsch, J., Marder, V. J., Clowes, A. W., and George, J. N., (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 387-410.
- [2] R. A. Briddell, J. E. Brandt, J. E. Straneva, E. F. Srour, and R. Hoffman, Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte, *Blood* 74 (1989) 145-151.
- [3] E. M. Mazur, R. Hoffman, J. Chasis, S. Marchesi, and E. Bruno, Immunofluorescent identification of human megakaryocyte colonies using an antiplatelet glycoprotein antiserum, *Blood* 57 (1981) 277-286.
- [4] W. Vainchenker, J. Bouguet, J. Guichard, and J. Breton-Gorius, Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors, *Blood* 54 (1979) 940-945.
- [5] N. Vitrat, K. Cohen-Solal, C. Pique, J. P. Le Couedic, F. Norol, A. K. Larsen, A. Katz, W. Vainchenker, and N. Debili, Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis, *Blood* 91 (1998) 3711-3723.
- [6] V. Baccini, L. Roy, N. Vitrat, H. Chagraoui, S. Sabri, J. P. Le Couedic, N. Debili, F. Wendling, and W. Vainchenker, Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes, *Blood* 98 (2001) 3274-3282.
- [7] L. Roy, P. Coullin, N. Vitrat, R. Hellio, N. Debili, J. Weinstein, A. Bernheim, and W. Vainchenker, Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes, *Blood* 97 (2001) 2238-2247.
- [8] J. Zimmet, and K. Ravid, Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system, *Exp Hematol* 28 (2000) 3-16.
- [9] L. A. Harker, Megakaryocyte quantitation, *J Clin Invest* 47 (1968) 452-457.
- [10] M. Hansen, and N. T. Pedersen, Circulating megakaryocytes in blood from the antecubital vein in healthy, adult humans, *Scand J Haematol* 20 (1978) 371-376.
- [11] R. F. Levine, A. Eldor, P. K. Shoff, S. Kirwin, D. Tenza, and E. M. Cramer, Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs, *Eur J Haematol* 51 (1993) 233-246.

- [12] D. Zucker-Franklin, and C. S. Philipp, Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept, *Am J Pathol* 157 (2000) 69-74.
- [13] J. H. Wright, The origin and nature of blood platelets, *Boston Med Surg J* 154 (1906) 643-645.
- [14] M. E. Bentfeld-Barker, and D. F. Bainton, Ultrastructure of rat megakaryocytes after prolonged thrombocytopenia, *J Ultrastruct Res* 61 (1977) 201-214.
- [15] E. M. Cramer, F. Norol, J. Guichard, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, J. M. Masse, and N. Debili, Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand, *Blood* 89 (1997) 2336-2346.
- [16] J. M. Radley, and G. Scurfield, The mechanism of platelet release, *Blood* 56 (1980) 996-999.
- [17] L. Lu, R. A. Briddell, C. D. Graham, J. E. Brandt, E. Bruno, and R. Hoffman, Effect of recombinant and purified human haematopoietic growth factors on in vitro colony formation by enriched populations of human megakaryocyte progenitor cells, *Br J Haematol* 70 (1988) 149-156.
- [18] N. Debili, C. Issaad, J. M. Masse, J. Guichard, A. Katz, J. Breton-Gorius, and W. Vainchenker, Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation, *Blood* 80 (1992) 3022-3035.
- [19] X. Du, and M. H. Ginsberg, Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function, *Thromb Haemost* 78 (1997) 96-100.
- [20] M. C. Berndt, Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner, and R. K. Andrews, The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex, *Thromb Haemost* 86 (2001) 178-188.
- [21] A. S. Asch, I. Liu, F. M. Briccetti, J. W. Barnwell, F. Kwakye-Berko, A. Dokun, J. Goldberger, and M. Pernambuco, Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain, *Science* 262 (1993) 1436-1440.

- [22] E. M. Cramer, G. F. Savidge, W. Vainchenker, M. C. Berndt, D. Pidard, J. P. Caen, J. M. Masse, and J. Breton-Gorius, Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes, *Blood* 75 (1990) 1220-1227.
- [23] T. Youssefian, J. M. Masse, F. Rendu, J. Guichard, and E. M. Cramer, Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa, *Blood* 89 (1997) 4047-4057.
- [24] L. Hatskelzon, B. I. Dalal, A. Shalev, C. Robertson, and J. M. Gerrard, Wide distribution of granulophysin epitopes in granules of human tissues, *Lab Invest* 68 (1993) 509-519.
- [25] S. J. Israels, J. M. Gerrard, Y. V. Jacques, A. McNicol, B. Cham, M. Nishibori, and D. F. Bainton, Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140), *Blood* 80 (1992) 143-152.
- [26] E. M. Cramer, N. Debili, J. F. Martin, A. M. Gladwin, J. Breton-Gorius, P. Harrison, G. F. Savidge, and W. Vainchenker, Uncoordinated expression of fibrinogen compared with thrombospondin and von Willebrand factor in maturing human megakaryocytes, *Blood* 73 (1989) 1123-1129.
- [27] P. Harrison, B. Wilbourn, N. Debili, W. Vainchenker, J. Breton-Gorius, A. S. Lawrie, J. M. Masse, G. F. Savidge, and E. M. Cramer, Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets, *J Clin Invest* 84 (1989) 1320-1324.
- [28] F. Rendu, and B. Brohard-Bohn, The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions, *Platelets* 12 (2001) 261-273.
- [29] J. J. Sixma, A. van den Berg, A. Hasilik, K. von Figura, and H. J. Geuze, Immuno-electron microscopical demonstration of lysosomes in human blood platelets and megakaryocytes using anti-cathepsin D, *Blood* 65 (1985) 1287-1291.
- [30] C. A. Dangelmaier, and H. Holmsen, Determination of acid hydrolases in human platelets, *Anal Biochem* 104 (1980) 182-191.
- [31] S. Emadi, M. Mirshahi, I. Elalamy, C. Nicolas, B. B. Vargaftig, and M. Hatmi, Cellular source of human platelet secretory phospholipase A2, *Br J Haematol* 100 (1998) 365-373.

- [32] H. K. Nieuwenhuis, J. J. van Oosterhout, E. Rozemuller, F. van Iwaarden, and J. J. Sixma, Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation, *Blood* 70 (1987) 838-845.
- [33] D. F. Bainton, The discovery of lysosomes, *J Cell Biol* 91 (1981) 66s-76s.
- [34] C. Emiliani, S. Martino, A. Orlicchio, R. Vezza, G. G. Nenci, and P. Gresele, Platelet glycohydrolase activities: characterization and release, *Cell Biochem Funct* 13 (1995) 31-39.
- [35] J. G. White, and C. C. Clawson, Overview article: biostructure of blood platelets, *Ultrastruct Pathol* 1 (1980) 533-558.
- [36] J. M. Gerrard, D. R. Phillips, G. H. Rao, E. F. Plow, D. A. Walz, R. Ross, L. A. Harker, and J. G. White, Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. Selective deficiency of platelet alpha granules, *J Clin Invest* 66 (1980) 102-109.
- [37] V. C. Broudy, N. L. Lin, and K. Kaushansky, Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro, *Blood* 85 (1995) 1719-1726.
- [38] F. Wendling, P. Varlet, M. Charon, and P. Tambourin, MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice, *Virology* 149 (1986) 242-246.
- [39] M. Souyri, I. Vigon, J. F. Penciolelli, J. M. Heard, P. Tambourin, and F. Wendling, A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors, *Cell* 63 (1990) 1137-1147.
- [40] I. Vigon, J. P. Mornon, L. Cocault, M. T. Mitjavila, P. Tambourin, S. Gisselbrecht, and M. Souyri, Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 5640-5644.

- [41] K. Kaushansky, and J. G. Drachman, The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production, *Oncogene* 21 (2002) 3359-3367.
- [42] E. Kelemen, I. Cserhati, and B. Tanos, Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera, *Acta Haematol* 20 (1958) 350-355.
- [43] T. Kato, A. Matsumoto, K. Ogami, T. Tahara, H. Morita, and H. Miyazaki, Native thrombopoietin: structure and function, 322-328.
- [44] T. D. Bartley, J. Bogenberger, P. Hunt, Y. S. Li, H. S. Lu, F. Martin, M. S. Chang, B. Samal, J. L. Nichol, S. Swift, and et al., Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl, *Cell* 77 (1994) 1117-1124.
- [45] S. Qian, F. Fu, W. Li, Q. Chen, and F. J. de Sauvage, Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout, *Blood* 92 (1998) 2189-2191.
- [46] R. Sungaran, B. Markovic, and B. H. Chong, Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization, *Blood* 89 (1997) 101-107.
- [47] K. Kaushansky, S. Lok, R. D. Holly, V. C. Broudy, N. Lin, M. C. Bailey, J. W. Forstrom, M. M. Buddle, P. J. Oort, F. S. Hagen, and et al., Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin, *Nature* 369 (1994) 568-571.
- [48] J. E. Rasko, E. O'Flaherty, and C. G. Begley, Mpl ligand (MGDF) alone and in combination with stem cell factor (SCF) promotes proliferation and survival of human megakaryocyte, erythroid and granulocyte/macrophage progenitors, *Stem Cells* 15 (1997) 33-42.
- [49] N. Debili, F. Wendling, A. Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, P. Hunt, and W. Vainchenker, The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors, *Blood* 86 (1995) 2516-2525.

- [50] K. Carver-Moore, H. E. Broxmeyer, S. M. Luoh, S. Cooper, J. Peng, S. A. Burstein, M. W. Moore, and F. J. de Sauvage, Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice, *Blood* 88 (1996) 803-808.
- [51] M. Murone, D. A. Carpenter, and F. J. de Sauvage, Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice, *Stem Cells* 16 (1998) 1-6.
- [52] J. Birkmann, S. Oez, M. Smetak, G. Kaiser, H. Kappauf, and W. M. Gallmeier, Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium, *Stem Cells* 15 (1997) 18-32.
- [53] J. L. Williams, G. G. Pipia, N. S. Datta, and M. W. Long, Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells, *Blood* 91 (1998) 4118-4126.
- [54] M. Schattner, P. Lefebvre, S. S. Mingolelli, C. L. Goolsby, A. Rademaker, J. G. White, D. Foster, D. Green, and I. Cohen, Thrombopoietin-stimulated ex vivo expansion of human bone marrow megakaryocytes, *Stem Cells* 14 (1996) 207-214.
- [55] H. Fujiki, T. Kimura, H. Minamiguchi, S. Harada, J. Wang, M. Nakao, S. Yokota, Y. Urata, Y. Ueda, H. Yamagishi, and Y. Sonoda, Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture, *Exp Hematol* 30 (2002) 1373-1380.
- [56] M. Yoshida, K. Tsuji, Y. Ebihara, K. Muraoka, R. Tanaka, H. Miyazaki, and T. Nakahata, Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture, *Br J Haematol* 98 (1997) 254-264.
- [57] S. E. Jacobsen, O. J. Borge, V. Ramsfjell, L. Cui, J. E. Cardier, O. P. Veiby, M. J. Murphy, Jr., and S. Lok, Thrombopoietin, a direct stimulator of viability and multilineage growth of primitive bone marrow progenitor cells, *Stem Cells* 14 (1996) 173-180.

- [58] J. G. Drachman, Y. Miyakawa, J. N. Luthi, D. D. Dahlen, A. Raney, A. E. Geddis, and K. Kaushansky, Studies with chimeric Mpl/JAK2 receptors indicate that both JAK2 and the membrane-proximal domain of Mpl are required for cellular proliferation, *J Biol Chem* 277 (2002) 23544-23553. Epub 22002 Apr 23529.
- [59] J. G. Drachman, K. M. Millett, and K. Kaushansky, Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2, *J Biol Chem* 274 (1999) 13480-13484.
- [60] Y. Miyakawa, P. Rojnuckarin, T. Habib, and K. Kaushansky, Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes, *J Biol Chem* 276 (2001) 2494-2502. Epub 2000 Oct 2427.
- [61] A. E. Geddis, N. E. Fox, and K. Kaushansky, Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors, *J Biol Chem* 276 (2001) 34473-34479. Epub 32001 Jun 34420.
- [62] H. Minamiguchi, T. Kimura, Y. Urata, H. Miyazaki, T. Bamba, T. Abe, and Y. Sonoda, Simultaneous signalling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC and MAPK pathways, *Br J Haematol* 115 (2001) 175-185.
- [63] P. Rojnuckarin, J. G. Drachman, and K. Kaushansky, Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis, *Blood* 94 (1999) 1273-1282.
- [64] P. Rojnuckarin, Y. Miyakawa, N. E. Fox, J. Deou, G. Daum, and K. Kaushansky, The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C ζ for thrombopoietin-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary murine megakaryocytes, *J Biol Chem* 276 (2001) 41014-41022. Epub 42001 Sep 41014.
- [65] W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J* 357 (2001) 593-615.
- [66] C. Nathan, and Q. W. Xie, Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, *Cell* 78 (1994) 915-918.

- [67] K. Asano, C. B. Chee, B. Gaston, C. M. Lilly, C. Gerard, J. M. Drazen, and J. S. Stamler, Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10089-10093.
- [68] F. Silvagno, H. Xia, and D. S. Bredt, Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle, *J Biol Chem* 271 (1996) 11204-11208.
- [69] P. W. Shaul, A. J. North, L. C. Wu, L. B. Wells, T. S. Brannon, K. S. Lau, T. Michel, L. R. Margraf, and R. A. Star, Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium, *J Clin Invest* 94 (1994) 2231-2236.
- [70] L. Kobzik, M. B. Reid, D. S. Bredt, and J. S. Stamler, Nitric oxide in skeletal muscle, *Nature* 372 (1994) 546-548.
- [71] J. L. Balligand, L. Kobzik, X. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. O'Hara, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel, Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes, *J Biol Chem* 270 (1995) 14582-14586.
- [72] J. L. Dinerman, T. M. Dawson, M. J. Schell, A. Snowman, and S. H. Snyder, Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 4214-4218.
- [73] M. E. Davis, H. Cai, G. R. Drummond, and D. G. Harrison, Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways, *Circ Res* 89 (2001) 1073-1080.
- [74] W. C. Sessa, K. Pritchard, N. Seyedi, J. Wang, and T. H. Hintze, Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression, *Circ Res* 74 (1994) 349-353.
- [75] A. Papapetropoulos, G. Garcia-Cardena, J. A. Madri, and W. C. Sessa, Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells, *J Clin Invest* 100 (1997) 3131-3139.

- [76] Y. Lee, and T. Shin, Expression of constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in the sciatic nerve of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis, *J Neuroimmunol* 126 (2002) 78-85.
- [77] R. M. Gomez, R. G. Pozner, M. A. Lazzari, L. P. D'Atri, S. Negrotto, A. M. Chudzinski-Tavassi, M. I. Berria, and M. Schattner, Endothelial cell function alteration after Junin virus infection, *Thromb Haemost* 90 (2003) 326-333.
- [78] T. Y. Ha, H. S. Kim, and T. Shin, Expression of constitutive endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase in the testis and epididymis of horse, *J Vet Med Sci* 66 (2004) 351-356.
- [79] J. B. Mannick, K. Asano, K. Izumi, E. Kieff, and J. S. Stamler, Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation, *Cell* 79 (1994) 1137-1146.
- [80] M. K. O'Bryan, S. Schlatt, O. Gerdprasert, D. J. Phillips, D. M. de Kretser, and M. P. Hedger, Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility, *Biol Reprod* 63 (2000) 1285-1293.
- [81] P. Ghafourifar, and C. Richter, Nitric oxide synthase activity in mitochondria, *FEBS Lett* 418 (1997) 291-296.
- [82] C. Giulivi, J. J. Poderoso, and A. Boveris, Production of nitric oxide by mitochondria, *J Biol Chem* 273 (1998) 11038-11043.
- [83] A. J. Kanai, L. L. Pearce, P. R. Clemens, L. A. Birder, M. M. VanBibber, S. Y. Choi, W. C. de Groat, and J. Peterson, Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 14126-14131.
- [84] T. E. Bates, A. Loesch, G. Burnstock, and J. B. Clark, Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation?, *Biochem Biophys Res Commun* 218 (1996) 40-44.
- [85] U. Frandsen, M. Lopez-Figueroa, and Y. Hellsten, Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun* 227 (1996) 88-93.

- [86] P. Ghafourifar, and E. Cadenas, Mitochondrial nitric oxide synthase, *Trends Pharmacol Sci* 26 (2005) 190-195.
- [87] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. M. Zeiher, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* 399 (1999) 601-605.
- [88] D. Fulton, J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos, and W. C. Sessa, Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt, *Nature* 399 (1999) 597-601.
- [89] G. Garcia-Cardena, R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, and W. C. Sessa, Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90, *Nature* 392 (1998) 821-824.
- [90] P. W. Shaul, E. J. Smart, L. J. Robinson, Z. German, I. S. Yuhanna, Y. Ying, R. G. Anderson, and T. Michel, Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae, *J Biol Chem* 271 (1996) 6518-6522.
- [91] J. C. Salerno, D. E. Harris, K. Irizarry, B. Patel, A. J. Morales, S. M. Smith, P. Martasek, L. J. Roman, B. S. Masters, C. L. Jones, B. A. Weissman, P. Lane, Q. Liu, and S. S. Gross, An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase, *J Biol Chem* 272 (1997) 29769-29777.
- [92] E. A. Ratovitski, M. R. Alam, R. A. Quick, A. McMillan, C. Bao, C. Kozlovsky, T. A. Hand, R. C. Johnson, R. E. Mains, B. A. Eipper, and C. J. Lowenstein, Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase, *J Biol Chem* 274 (1999) 993-999.
- [93] D. A. Calhoun, and S. Oparil, Treatment of hypertensive crisis, *N Engl J Med* 323 (1990) 1177-1183.
- [94] J. Varon, and P. E. Marik, The diagnosis and management of hypertensive crises, *Chest* 118 (2000) 214-227.
- [95] J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, and K. L. K., New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines., *J Org Chem* 58 (1993) 1472-1476.
- [96] C. M. Maragos, D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie, and L. K. Keefer, Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects, *J Med Chem* 34 (1991) 3242-3247.

- [97] L. J. Ignarro, Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein, *Circ Res* 65 (1989) 1-21.
- [98] R. F. Furchgott, and J. V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373-376.
- [99] P. L. Huang, Z. Huang, H. Mashimo, K. D. Bloch, M. A. Moskowitz, J. A. Bevan, and M. C. Fishman, Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase, *Nature* 377 (1995) 239-242.
- [100] J. A. Panza, A. A. Quyyumi, J. E. Brush, Jr., and S. E. Epstein, Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension, *N Engl J Med* 323 (1990) 22-27.
- [101] R. G. Kilbourn, A. Jubran, S. S. Gross, O. W. Griffith, R. Levi, J. Adams, and R. F. Lodato, Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, *Biochem Biophys Res Commun* 172 (1990) 1132-1138.
- [102] L. J. Ignarro, Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism, *Blood Vessels* 28 (1991) 67-73.
- [103] A. Horowitz, C. B. Menice, R. Laporte, and K. G. Morgan, Mechanisms of smooth muscle contraction, *Physiol Rev* 76 (1996) 967-1003.
- [104] V. M. Bolotina, S. Najibi, J. J. Palacino, P. J. Pagano, and R. A. Cohen, Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature* 368 (1994) 850-853.
- [105] A. Pfeifer, P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G. X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K. E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler, and F. Hofmann, Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice, *EMBO J* 17 (1998) 3045-3051.
- [106] J. Schlossmann, A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth, Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β , *Nature* 404 (2000) 197-201.

- [107] H. K. Simmerman, and L. R. Jones, Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function, *Physiol Rev* 78 (1998) 921-947.
- [108] J. E. Freedman, R. Sauter, E. M. Battinelli, K. Ault, C. Knowles, P. L. Huang, and J. Loscalzo, Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene, *Circ Res* 84 (1999) 1416-1421.
- [109] J. Loscalzo, Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis, *Circ Res* 88 (2001) 756-762.
- [110] D. I. Simon, J. S. Stamler, E. Loh, J. Loscalzo, S. A. Francis, and M. A. Creager, Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans, *J Cardiovasc Pharmacol* 26 (1995) 339-342.
- [111] Z. Q. Yan, T. Yokota, W. Zhang, and G. K. Hansson, Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery, *Circ Res* 79 (1996) 38-44.
- [112] M. A. Moro, R. J. Russel, S. Cellek, I. Lizasoain, Y. Su, V. M. Darley-Usmar, M. W. Radomski, and S. Moncada, cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 1480-1485.
- [113] L. Cavallini, M. Coassin, A. Borean, and A. Alexandre, Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation, *J Biol Chem* 271 (1996) 5545-5551.
- [114] M. E. Mendelsohn, S. O'Neill, D. George, and J. Loscalzo, Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine, *J Biol Chem* 265 (1990) 19028-19034.
- [115] A. D. Michelson, S. E. Benoit, M. I. Furman, W. L. Breckwoldt, M. J. Rohrer, M. R. Barnard, and J. Loscalzo, Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins, *Am J Physiol* 270 (1996) H1640-1648.
- [116] E. S. Trepakova, R. A. Cohen, and V. M. Bolotina, Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-dependent refilling of Ca²⁺ stores, *Circ Res* 84 (1999) 201-209.

- [117] T. H. Fischer, and G. C. White, 2nd, Partial purification and characterization of thrombolamban, a 22,000 dalton cAMP-dependent protein kinase substrate in platelets, *Biochem Biophys Res Commun* 149 (1987) 700-706.
- [118] A. Pigazzi, S. Heydrick, F. Folli, S. Benoit, A. Michelson, and J. Loscalzo, Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets, *J Biol Chem* 274 (1999) 14368-14375.
- [119] E. K. Jang, J. E. Azzam, N. T. Dickinson, M. M. Davidson, and R. J. Haslam, Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside, *Br J Haematol* 117 (2002) 664-675.
- [120] T. H. Fischer, and G. C. White, 2nd, cAMP-dependent protein kinase substrates in platelets. Evidence that thrombolamban, a 22,000 dalton substrate, and the Ca⁺⁺-ATPase are not associated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 159 (1989) 644-650.
- [121] J. Geiger, C. Nolte, and U. Walter, Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors, *Am J Physiol* 267 (1994) C236-244.
- [122] W. Hauser, K. P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter, and M. Zimmer, Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 8120-8125.
- [123] K. Horstrup, B. Jablonka, P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, and U. Walter, Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition, *Eur J Biochem* 225 (1994) 21-27.
- [124] A. Aszodi, A. Pfeifer, M. Ahmad, M. Glauner, X. H. Zhou, L. Ny, K. E. Andersson, B. Kehrel, S. Offermanns, and R. Fassler, The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function, *EMBO J* 18 (1999) 37-48.

- [125] C. Selleri, and J. P. Maciejewski, Nitric oxide and cell survival: megakaryocytes say "NO", *J Lab Clin Med* 137 (2001) 225-230.
- [126] J. P. Maciejewski, C. Selleri, T. Sato, H. J. Cho, L. K. Keefer, C. F. Nathan, and N. S. Young, Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha, *J Clin Invest* 96 (1995) 1085-1092.
- [127] C. Selleri, T. Sato, A. M. Raiola, B. Rotoli, N. S. Young, and J. P. Maciejewski, Induction of nitric oxide synthase is involved in the mechanism of Fas-mediated apoptosis in haemopoietic cells, *Br J Haematol* 99 (1997) 481-489.
- [128] P. J. Shami, and J. B. Weinberg, Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells, *Blood* 87 (1996) 977-982.
- [129] J. B. Weinberg, Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review, *Mol Med* 4 (1998) 557-591.
- [130] R. J. van't Hof, K. J. Armour, L. M. Smith, K. E. Armour, X. Q. Wei, F. Y. Liew, and S. H. Ralston, Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 7993-7998.
- [131] C. J. Punjabi, D. L. Laskin, D. E. Heck, and J. D. Laskin, Production of nitric oxide by murine bone marrow cells. Inverse correlation with cellular proliferation, *J Immunol* 149 (1992) 2179-2184.
- [132] J. P. Kolb, Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia, *Leukemia* 14 (2000) 1685-1694.
- [133] I. Angulo, J. Rullas, J. A. Campillo, E. Obregon, A. Heath, M. Howard, M. A. Munoz-Fernandez, and J. L. Subiza, Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF-alpha and IL-1alpha, *Eur J Immunol* 30 (2000) 1263-1271.

- [134] J. W. Lee, C. Beckham, B. R. Michel, H. Rosen, and H. J. Deeg, HLA-DR-mediated signals for hematopoiesis and induction of apoptosis involve but are not limited to a nitric oxide pathway, *Blood* 90 (1997) 217-225.
- [135] T. Michurina, P. Krasnov, A. Balazs, N. Nakaya, T. Vasilieva, B. Kuzin, N. Khrushchov, R. C. Mulligan, and G. Enikolopov, Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity, *Mol Ther* 10 (2004) 241-248.
- [136] A. Bishop, and J. E. Anderson, NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological, *Toxicology* 208 (2005) 193-205.
- [137] S. Moncada, and J. D. Erusalimsky, Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 214-220.
- [138] C. Bogdan, Nitric oxide and the immune response, *Nat Immunol* 2 (2001) 907-916.
- [139] R. A. Lockshin, and C. M. Williams, Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms, *J Insect Physiol* 10 (1964) 643-649.
- [140] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257.
- [141] G. T. Williams, C. A. Smith, N. J. McCarthy, and E. A. Grimes, Apoptosis: final control point in cell biology, *Trends Cell Biol* 2 (1992) 263-267.
- [142] H. M. Ellis, and H. R. Horvitz, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell* 44 (1986) 817-829.
- [143] E. Maeno, Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama, and Y. Okada, Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 9487-9492.
- [144] S. Hortelano, M. L. Garcia-Martin, S. Cerdan, A. Castrillo, A. M. Alvarez, and L. Bosca, Intracellular water motion decreases in apoptotic macrophages after caspase activation, *Cell Death Differ* 8 (2001) 1022-1028.

- [145] G. Majno, and I. Joris, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am J Pathol* 146 (1995) 3-15.
- [146] K. S. Ravichandran, "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal, *Cell* 113 (2003) 817-820.
- [147] B. Verhoven, R. A. Schlegel, and P. Williamson, Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes, *J Exp Med* 182 (1995) 1597-1601.
- [148] A. H. Wyllie, R. G. Morris, A. L. Smith, and D. Dunlop, Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis, *J Pathol* 142 (1984) 67-77.
- [149] M. O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407 (2000) 770-776.
- [150] G. M. Cohen, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J* 326 (1997) 1-16.
- [151] H. R. Stennicke, and G. S. Salvesen, Catalytic properties of the caspases, *Cell Death Differ* 6 (1999) 1054-1059.
- [152] A. H. Wyllie, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature* 284 (1980) 555-556.
- [153] M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391 (1998) 43-50.
- [154] H. Sakahira, M. Enari, and S. Nagata, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391 (1998) 96-99.
- [155] T. Rudel, and G. M. Bokoch, Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2, *Science* 276 (1997) 1571-1574.
- [156] A. Zeuner, A. Eramo, C. Peschle, and R. De Maria, Caspase activation without death, *Cell Death Differ* 6 (1999) 1075-1080.

- [157] A. M. Verhagen, J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux, HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins, *J Biol Chem* 277 (2002) 445-454. Epub 2001 Oct 2016.
- [158] A. Gross, J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev* 13 (1999) 1899-1911.
- [159] H. Li, H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94 (1998) 491-501.
- [160] T. F. Franke, D. R. Kaplan, and L. C. Cantley, PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis, *Cell* 88 (1997) 435-437.
- [161] A. Bonni, A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg, Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms, *Science* 286 (1999) 1358-1362.
- [162] S. Pugazhenti, A. Nesterova, C. Sable, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, L. E. Heasley, and J. E. Reusch, Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein, *J Biol Chem* 275 (2000) 10761-10766.
- [163] J. Xing, D. D. Ginty, and M. E. Greenberg, Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase, *Science* 273 (1996) 959-963.
- [164] H. Avraham, S. Cowley, S. Y. Chi, S. Jiang, and J. E. Groopman, Characterization of adhesive interactions between human endothelial cells and megakaryocytes, *J Clin Invest* 91 (1993) 2378-2384.
- [165] S. Zweegman, M. A. Veenhof, P. C. Huijgens, G. J. Schuurhuis, and A. M. Drager, Regulation of megakaryocytopoiesis in an in vitro stroma model: preferential adhesion of megakaryocytic progenitors and subsequent inhibition of maturation, *Exp Hematol* 28 (2000) 401-410.

- [166] M. Schattner, D. Green, and I. Cohen, Stromal-conditioned medium synergizes with thrombopoietin in stimulating megakaryocytopoiesis, *Stem Cells* 16 (1998) 61-65.
- [167] E. Bruno, R. A. Briddell, R. J. Cooper, and R. Hoffman, Effects of recombinant interleukin 11 on human megakaryocyte progenitor cells, *Exp Hematol* 19 (1991) 378-381.
- [168] T. Ishibashi, H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese, and S. A. Burstein, Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 5953-5957.
- [169] D. A. Clark, and E. N. Dessypris, Effects of recombinant erythropoietin on murine megakaryocytic colony formation in vitro, *J Lab Clin Med* 108 (1986) 423-429.
- [170] B. Schmitz, A. Radbruch, T. Kummel, C. Wickenhauser, H. Korb, M. L. Hansmann, J. Thiele, and R. Fischer, Magnetic activated cell sorting (MACS)--a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: comparison of different separation techniques, *Eur J Haematol* 52 (1994) 267-275.
- [171] A. Tomer, L. A. Harker, and S. A. Burstein, Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes, *Blood* 71 (1988) 1244-1252.
- [172] F. Norol, N. Vitrat, E. Cramer, J. Guichard, S. A. Burstein, W. Vainchenker, and N. Debili, Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells, *Blood* 91 (1998) 830-843.
- [173] E. S. Choi, J. L. Nichol, M. M. Hokom, A. C. Hornkohl, and P. Hunt, Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional, *Blood* 85 (1995) 402-413.
- [174] E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J Clin Invest* 52 (1973) 2745-2756.
- [175] C. L. Yu, D. Haskard, D. Cavender, and M. Ziff, Effects of bacterial lipopolysaccharide on the binding of lymphocytes to endothelial cell monolayers, *J Immunol* 136 (1986) 569-573.

- [176] D. Metcalf, Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?, *Blood* 82 (1993) 3515-3523.
- [177] S. Rafii, F. Shapiro, R. Pettengell, B. Ferris, R. L. Nachman, M. A. Moore, and A. S. Asch, Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors, *Blood* 86 (1995) 3353-3363.
- [178] E. Battinelli, S. R. Willoughby, T. Foxall, C. R. Valeri, and J. Loscalzo, Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 14458-14463.
- [179] F. Schwede, E. Maronde, H. Genieser, and B. Jastorff, Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs, *Pharmacol Ther* 87 (2000) 199-226.
- [180] J. P. Stasch, E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, A. Feurer, R. Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiss, H. Schroder, W. Schroeder, E. Stahl, W. Steinke, A. Straub, and M. Schramm, NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase, *Nature* 410 (2001) 212-215.
- [181] C. Lugnier, P. Schoeffter, A. Le Bec, E. Strouthou, and J. C. Stoclet, Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta, *Biochem Pharmacol* 35 (1986) 1743-1751.
- [182] S. De Botton, S. Sabri, E. Daugas, Y. Zermati, J. E. Guidotti, O. Hermine, G. Kroemer, W. Vainchenker, and N. Debili, Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes, *Blood* 100 (2002) 1310-1317.
- [183] Q. L. Deveraux, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and J. C. Reed, Endogenous inhibitors of caspases, *J Clin Immunol* 19 (1999) 388-398.
- [184] C. Sanz, I. Benet, C. Richard, B. Badia, E. J. Andreu, F. Prosper, and J. L. Fernandez-Luna, Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes, *Exp Hematol* 29 (2001) 728-735.

- [185] K. Kirito, T. Watanabe, K. Sawada, H. Endo, K. Ozawa, and N. Komatsu, Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways, *J Biol Chem* 277 (2002) 8329-8337. Epub 2001 Dec 8327.
- [186] M. Majka, J. Ratajczak, G. Villaire, K. Kubiczek, L. A. Marquez, A. Janowska-Wieczorek, and M. Z. Ratajczak, Thrombopoietin, but not cytokines binding to gp130 protein-coupled receptors, activates MAPKp42/44, AKT, and STAT proteins in normal human CD34+ cells, megakaryocytes, and platelets, *Exp Hematol* 30 (2002) 751-760.
- [187] P. J. Fielder, A. L. Gurney, E. Stefanich, M. Marian, M. W. Moore, K. Carver-Moore, and F. J. de Sauvage, Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets, *Blood* 87 (1996) 2154-2161.
- [188] M. C. Clarke, J. Savill, D. B. Jones, B. S. Noble, and S. B. Brown, Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death, *J Cell Biol* 160 (2003) 577-587.
- [189] H. Nagahisa, Y. Nagata, T. Ohnuki, M. Osada, T. Nagasawa, T. Abe, and K. Todokoro, Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation, *Blood* 87 (1996) 1309-1316.
- [190] M. Tavassoli, and M. Aoki, Localization of megakaryocytes in the bone marrow, *Blood Cells* 15 (1989) 3-14.
- [191] G. M. Romo, J. F. Dong, A. J. Schade, E. E. Gardiner, G. S. Kansas, C. Q. Li, L. V. McIntire, M. C. Berndt, and J. A. Lopez, The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin, *J Exp Med* 190 (1999) 803-814.
- [192] M. H. Helfrich, D. E. Evans, P. S. Grabowski, J. S. Pollock, H. Ohshima, and S. H. Ralston, Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures, *J Bone Miner Res* 12 (1997) 1108-1115.
- [193] S. M. Lohmann, and U. Walter, Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases (cGK), *Front Biosci* 10 (2005) 1313-1328.

- [194] Z. Li, J. Ajdic, M. Eigenthaler, and X. Du, A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans, *Blood* 101 (2003) 4423-4429. Epub 2003 Feb 4426.
- [195] E. Battinelli, and J. Loscalzo, Nitric oxide induces apoptosis in megakaryocytic cell lines, *Blood* 95 (2000) 3451-3459.
- [196] C. F. Wu, N. H. Bishopric, and R. E. Pratt, Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes, *J Biol Chem* 272 (1997) 14860-14866.
- [197] M. J. Pollman, T. Yamada, M. Horiuchi, and G. H. Gibbons, Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II, *Circ Res* 79 (1996) 748-756.
- [198] N. Suenobu, M. Shichiri, M. Iwashina, F. Marumo, and Y. Hirata, Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 140-146.
- [199] A. C. Loweth, G. T. Williams, J. H. Scarpello, and N. G. Morgan, Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15, *FEBS Lett* 400 (1997) 285-288.
- [200] N. Peunova, and G. Enikolopov, Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells, *Nature* 375 (1995) 68-73.
- [201] E. Ciani, S. Guidi, R. Bartesaghi, and A. Contestabile, Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide, *J Neurochem* 82 (2002) 1282-1289.
- [202] J. E. Albina, S. Cui, R. B. Mateo, and J. S. Reichner, Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages, *J Immunol* 150 (1993) 5080-5085.
- [203] Y. Yoshioka, A. Yamamuro, and S. Maeda, Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway, *Br J Pharmacol* 139 (2003) 28-34.

- [204] B. Herrera, A. M. Alvarez, A. Sanchez, M. Fernandez, C. Roncero, M. Benito, and I. Fabregat, Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes, *FASEB J* 15 (2001) 741-751.
- [205] J. E. Meredith, Jr., B. Fazeli, and M. A. Schwartz, The extracellular matrix as a cell survival factor, *Mol Biol Cell* 4 (1993) 953-961.
- [206] N. Latif, M. A. Khan, E. Birks, A. O'Farrell, J. Westbrook, M. J. Dunn, and M. H. Yacoub, Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure, *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 1769-1777.
- [207] Q. L. Deveraux, N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J* 17 (1998) 2215-2223.
- [208] J. Li, and D. J. Kuter, The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release, *Int J Hematol* 74 (2001) 365-374.
- [209] P. Lecine, J. E. Italiano, Jr., S. W. Kim, J. L. Villeval, and R. A. Shivdasani, Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2, *Blood* 96 (2000) 1366-1373.
- [210] P. Lecine, J. L. Villeval, P. Vyas, B. Swencki, Y. Xu, and R. A. Shivdasani, Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes, *Blood* 92 (1998) 1608-1616.
- [211] R. A. Shivdasani, M. F. Rosenblatt, D. Zucker-Franklin, C. W. Jackson, P. Hunt, C. J. Saris, and S. H. Orkin, Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development, *Cell* 81 (1995) 695-704.
- [212] S. Nagase, H. Isobe, K. Ayukawa, H. Sakai, and H. Nawata, Inhibition of nitric oxide production increases dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats, *J Hepatol* 23 (1995) 601-604.

[213] M. Molnar, T. Suto, T. Toth, and F. Hertelendy, Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation, *Am J Obstet Gynecol* 170 (1994) 1458-1466.

[214] M. W. Radomski, R. M. Palmer, and S. Moncada, The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium, *Biochem Biophys Res Commun* 148 (1987) 1482-1489.

[215] J. C. de Graaf, J. D. Banga, S. Moncada, R. M. Palmer, P. G. de Groot, and J. J. Sixma, Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions, *Circulation* 85 (1992) 2284-2290.

[216] S. T. Avezilla, K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D. K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T. E. Hartman, N. R. Hackett, R. G. Crystal, L. Witte, D. J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage, and S. Rafii, Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis, *Nat Med* 10 (2004) 64-71. Epub 2003 Dec 2021.