

## Tesis de Maestría

# Rol de las quimoquinas CXC en pacientes con trombocitemia esencial

Salim, Juan Pablo

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Maestría de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Salim, Juan Pablo. (2006). Rol de las quimoquinas CXC en pacientes con trombocitemia esencial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4847\\_Salim](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4847_Salim)

**Cita tipo Chicago:**

Salim, Juan Pablo. "Rol de las quimoquinas CXC en pacientes con trombocitemia esencial". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4847\\_Salim](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4847_Salim)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Tesis de maestría

Biología Molecular Médica

“Rol de las quimoquinas CXC en pacientes con  
trombocitemia esencial”

Juan Pablo Salim

Director: Felisa C. Molinas

Codirector: Rosana F. Marta

2006

03/12/2007.  
474.079/02

HEMATOLOGIA INVESTIGACION

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS A. LANARI

80709

## Introducción

### Hematopoyesis y Megacariopoyesis

El desarrollo de las células sanguíneas (hematopoyesis) involucra un complejo proceso en el cual las células progenitoras, *stem* hematopoyéticas, se ven influenciadas por factores de crecimiento endócrinos, parácrinos y células del estroma del microambiente de médula ósea (1). El microambiente, compuesto por células endoteliales, fibroblastos, adipocitos, monocitos y células intersticiales, actúa para proveer moléculas de matriz extracelular y secretar factores de crecimiento, quimoquinas y citoquinas, que ayudan a regular el crecimiento, maduración y el tránsito de células progenitoras. En este microambiente las células hematopoyéticas proliferan y se diferencian. Luego de madurar, las células deben atravesar los sinusoides para entrar a la circulación. Las interacciones celulares entre precursores, células estromales y células endoteliales de médula ósea, sirven de múltiples funciones, incluyendo retención de células progenitoras en el tejido hematopoyético y regulación de la liberación de células maduras hacia la circulación.(2)

Los megacariocitos se originan a partir de una célula *stem* hematopoyética pluripotencial, la cual en un primer momento prolifera para luego diferenciarse a células progenitoras comprometidas al linaje megacariocítico. La siguiente fase involucra poliploidización nuclear, aumento del tamaño celular y formación del sistema de membranas de demarcación en el citoplasma. Por último se producen los fragmentos proplaquetarios que darán lugar a las plaquetas, generando además un cuerpo apoptótico residual correspondiente al núcleo del megacariocito (3). Todo el proceso está dirigido por la acción coordinada de citoquinas hematopoyéticas y factores de transcripción restringidos al linaje.

(Fig1). Además de los efectores que actúan promoviendo este proceso, también están aquellos que lo regulan negativamente (4).

**Citoquinas involucradas en la megacariocitopoyesis**

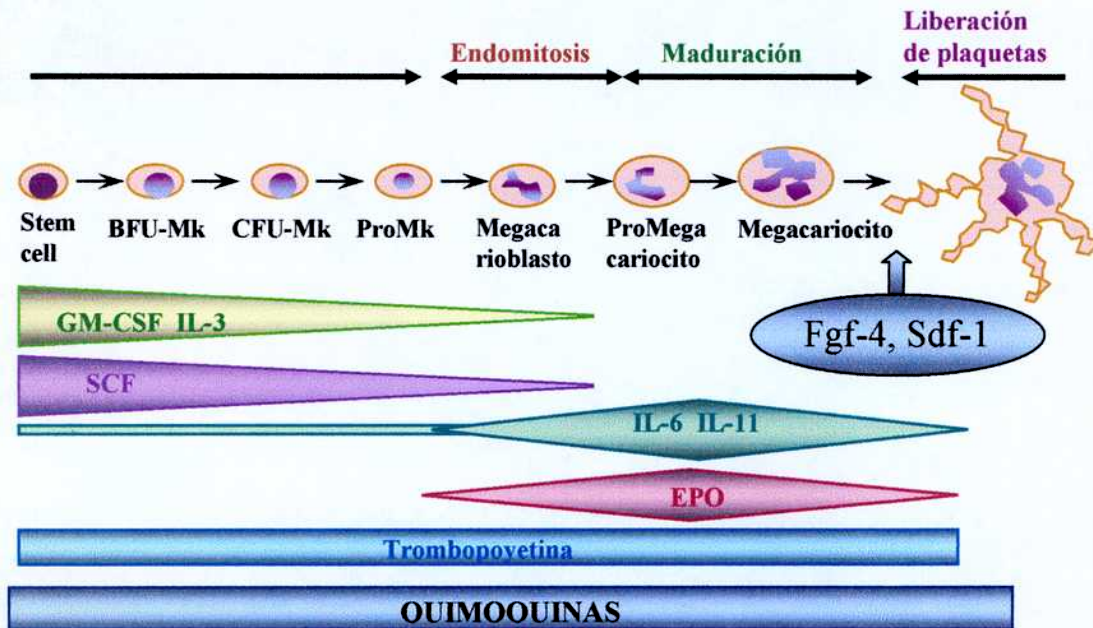


Fig.1: Esquema del desarrollo del linaje megacariocítico a partir de la célula Stem hasta la formación de plaquetas. Puede verse la participación de las distintas citoquinas y quimoquinas intervinientes.-

**Quimoquinas: generalidades y acciones**

Las quimoquinas constituyen una superfamilia de pequeñas proteínas de 8 a 10 Kda. Existen más de 50 quimoquinas conocidas, las cuales son clasificadas en 4 subgrupos de acuerdo a la posición de un residuo de cisteína invariable cerca de la porción amino terminal de la molécula. Las dos familias mas grandes son la CC y CXC, donde X puede ser cualquier aminoácido; también existen las quimoquinas C y CX3C (5). Fig.2.

Las quimoquinas son citoquinas inducibles, de secreción, proinflamatorias involucradas en una amplia variedad de respuestas, actuando principalmente como quimioattractantes y activadores de tipos específicos de leucocitos (6, 7).

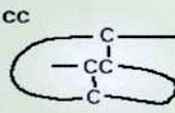









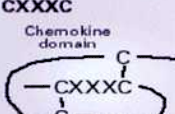
Chemokine	Receptor	Cell Type
 <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES</p>	 <p>CCR1 CCR3</p>	Eosinophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\beta$ (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
PARC, DC-CK1 Lymphotactin	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\alpha$ (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4	
Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
 <p>Fractalkine</p>	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Fig. 2: Quimoquinas y sus receptores. Puede observarse la distribución de los residuos de cisteínas en las moléculas de quimoquinas que darán lugar a las diferentes subfamilias. También se describe la correspondencia entre los distintos ligandos y los correspondientes receptores, así como la distribución de los mismos en los diferentes tipos celulares. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):436-45.

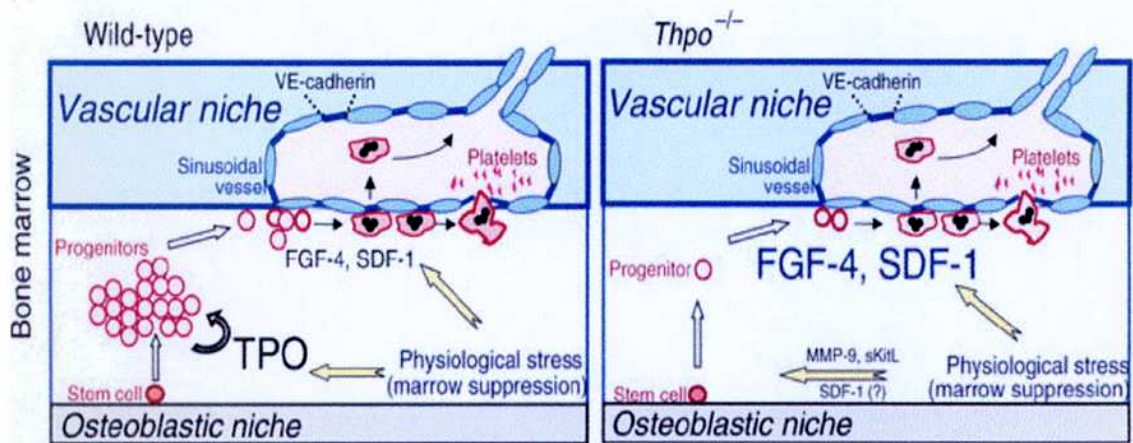
Además de su rol como reguladoras del reclutamiento y el tráfico leucocitario (8) , las quimoquinas actúan sobre otros tipos celulares no leucocitarios tales como fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos y líneas celulares de melanomas. Otras quimoquinas están implicadas en la reparación de heridas, angiogénesis e infección viral.

### **Acción de las quimoquinas en la megacariopoyesis**

Se vio que ciertas quimoquinas actúan sobre células progenitoras hematopoyéticas demostrándose que un número de quimoquinas de las subfamilias C, CC y CXC como por ejemplo PF4, IL-8 y GRO-1, son potentes inhibidores de la megacariocitopoyesis humana (9). Dentro de las quimoquinas CXC sin actividad supresora se encuentran: GRO- $\alpha$ , GRO- $\gamma$  y SDF-1 entre otras. Se observó además, que los megacariocitos, plaquetas y progenitores expresan receptores para quimoquinas (9-11) Estudios fenotípicos de moléculas en la superficie celular muestran variaciones en la expresión de receptores de quimoquinas a lo largo del desarrollo megacariocítico. Estos datos sugieren que las quimoquinas presentes en el microambiente medular, pueden jugar un rol fisiológico de regulación en el desarrollo del megacariocito humano, tanto por mecanismos autócrinos como parácrinos.

Los receptores de quimoquinas CXCR4 para SDF-1, CXCR1 y CXCR2 para IL-8 y GRO-1 están presentes en la superficie de progenitores de megacariocitos, en las células maduras (10, 12, 13) y en la membrana plaquetaria. Se ha descrito la capacidad de algunas quimoquinas para potenciar la función plaquetaria iniciada por otros agonistas específicos o inducir la activación plaquetaria por si mismas (12, 14, 15).

En relación al proceso de megacariocitopoyesis normal, se encontró que el SDF-1 incrementa la poliploidización y migración transendotelial de los megacariocitos favoreciendo la producción plaquetaria. Avecilla y colaboradores describieron la habilidad del SDF-1 y FGF-4 para relocalizar los progenitores megacariocíticos en el nicho vascular, promoviendo la supervivencia, maduración y liberación de proplaquetas, permitiendo de ésta manera restaurar la trombopoyesis en ratones K.O para la trombopoyetina o su receptor *cmp-1*, mediante un mecanismo independiente de citoquinas (16).



*Fig.3. La trombopoyetina induce proliferación en el ratón wild-type (izquierda), mientras que la maduración y diferenciación ocurre en ausencia de trombopoyetina (derecha). Las quimoquinas promueven la interacción de los progenitores con el nicho vascular induciendo la expresión de moléculas de adhesión y la motilidad del megacariocito. El incremento en los niveles de quimoquinas pueden compensar la ausencia de trombopoyetina (derecha) localizando los progenitores en el nicho vascular, lo que conduce a la diferenciación, maduración y producción plaquetaria.*

## Receptores de quimoquinas

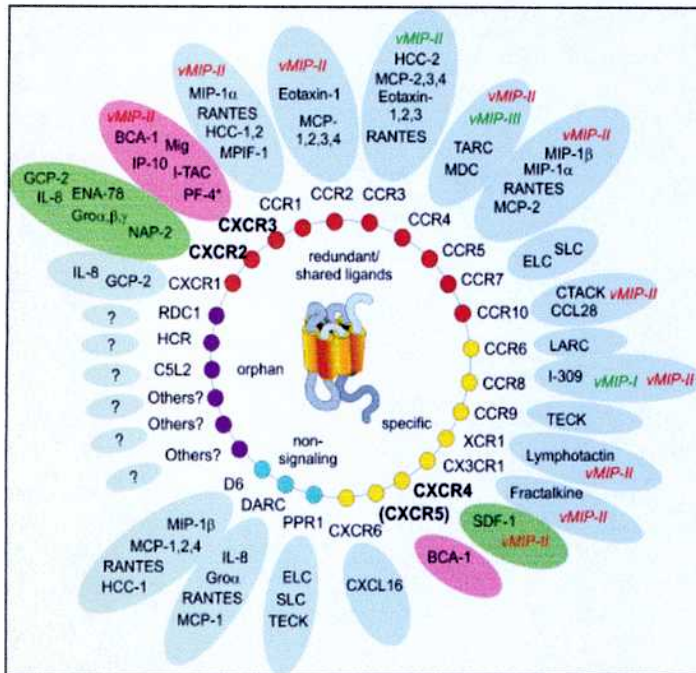


Fig. 4: el sistema de quimoquinas y sus receptores. correspondencia de los diferentes receptores con sus ligandos. Pueden verse receptores con un unico ligando y receptores redundanes o compartidos que son controlados por mas de una quimoquina.

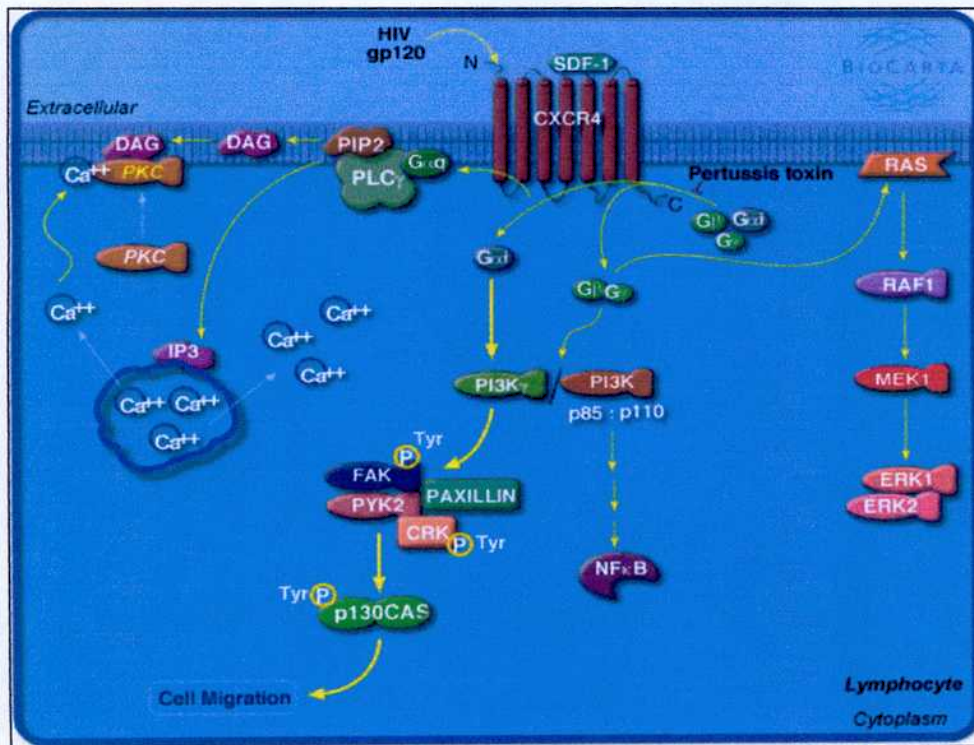
Las quimoquinas median sus efectos a través de la unión a una variada gama de receptores. Algunas quimoquinas se unen a más de un receptor y algunos receptores unen más de una quimoquina. Aunque cada receptor puede ligar solamente un subgrupo de quimoquinas, ellos pueden unir varios miembros de la misma clase con alta afinidad. Para la subfamilia CXC existen cinco receptores identificados, denominados desde CXCR1 a CXCR5. Los receptores CXCR1, CXCR2 y CXCR3 unen numerosas quimoquinas mientras que CXCR4 y CXCR5 han mostrado unir solo una cada uno. Los receptores pertenecen a una subfamilia de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) los cuales se caracterizan por poseer siete dominios transmembrana con un segmento amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citoplasmático. El receptor está acoplado a una proteína G heterotrimérica ( $G \alpha - \beta - \gamma$ ) determinando múltiples funciones biológicas.



## Mecanismo general de transduccion de señal

### Mecanismo proteina G dependiente

Cuando la quimoquina se une a su receptor se inicia una serie de cascadas de eventos intracelulares que culmina en la expresión de los efectos biológicos.



*Fig. 5: cascada de señales a partir de la unión del SDF-1 con su receptor CXCR4 en un linfocito. Fuente: Biocarta.*

El primer paso en este complejo proceso es la unión del receptor a su ligando con alta afinidad. Este induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de la proteína Gi heterotrimérica asociada al receptor en las subunidades  $\alpha$  y el complejo  $\beta$ - $\gamma$ . Tanto la subunidad  $\alpha$  como el complejo  $\beta$ - $\gamma$  actúan como segundos mensajeros para la traducción de la señal. Esas subunidades pueden activar varios efectores que finalmente conducirán a la

regulación de diversos procesos tales como transcripción génica, migración celular y adhesión celular.

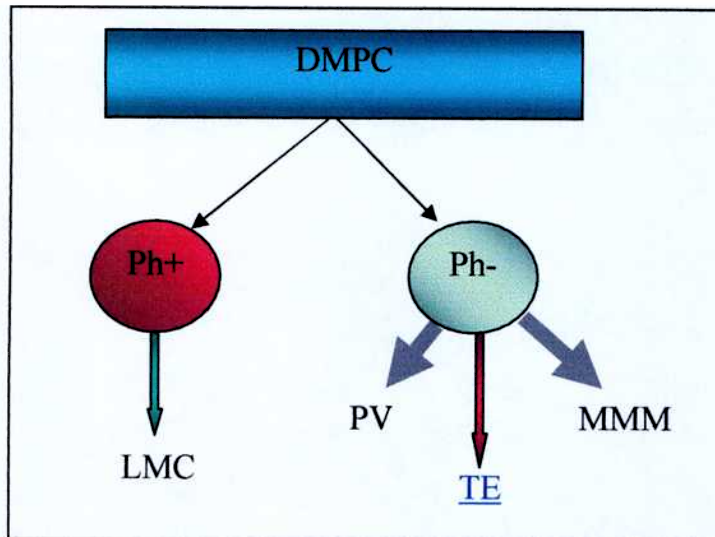
#### Mecanismos independientes de proteína G

Al unirse al receptor, SDF induciría la asociación transiente de JAK2 y JAK3 con el CXCR4 llevando a la activación y traslocación nuclear de las proteínas STAT.

También se vio que las arrestinas además de funcionar como interruptores de la señal actuarían como soporte de una serie de moléculas de señalización permitiendo la activación de cascadas y la migración.

#### **Desórdenes mieloproliferativos crónicos**

Los desórdenes mieloproliferativos crónicos se caracterizan por la expansión clonal de células progenitoras hematopoyéticas que llevan a la proliferación de uno o más linajes celulares en médula ósea y sangre periférica. Estos desórdenes pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a la presencia o no del cromosoma Philadelphia, t(9:22). Así, la leucemia mieloide crónica que presenta esta anomalía cromosómica se halla dentro del primer grupo y el resto, Policitemia Vera, Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide y Trombocitemia Esencial, se encuentran dentro del grupo cromosoma Philadelphia negativo.



*Fig. 6: Diagrama de clasificación de los desórdenes mieloproliferativos crónicos (DMPC). (Ph: cromosoma philadelphia, LMC: leucemia mieloide crónica, PV: policitemia vera, TE: trombocitemia esencial, MMM: mielofibrosis con metaplasia mieloide)*

La trombocitemia esencial (TE) se caracteriza por una hiperplasia megacariocítica y trombocitosis persistente (17-19). El diagnóstico se realiza por exclusión de trombocitosis asociada a otros desórdenes mieloproliferativos, trombocitosis reactiva y mielodisplasia. Aunque se dispone de una creciente cantidad de conocimientos concernientes a la patología, el marcador molecular de esta enfermedad aún no se conoce. La mutación somática descrita recientemente, en el dominio autoinhibitorio de la Janus Kinasa 2, V617F JAK2 y que le confiere una ganancia funcional, no explica la fisiopatología de la TE ya que sólo se ha hallado en el 30 al 50% de los pacientes (20-22).

Existen referencias sobre la participación de las quimoquinas en otros desórdenes mieloproliferativos. Se ha descrito un aumento en los niveles séricos de IL-8 en pacientes con mielofibrosis con metaplasia mieloide (23) así como en policitemia vera (24).

## **Objetivo**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de las quimoquinas hematopoyéticas de la familia CXC, involucradas en la megacariopoyesis: SDF-1, IL-8 y GRO-1, en un grupo de pacientes con un desorden mieloproliferativo caracterizado por el aumento de megacariocitos en medula osea y plaquetas en circulación, denominado trombocitemia esencial.

## **Materiales y métodos**

### **Pacientes y controles**

Para este estudio se incluyeron 40 pacientes con TE, diagnosticados de acuerdo a los criterios del Grupo de Estudio de la Policitemia Vera (PVSG) (19). La edad media fue de 45 años, 32 fueron del sexo femenino. También se tomaron para este estudio muestras de 40 sujetos sanos apareados por edad y sexo. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del instituto A. Lanari y el consentimiento informado se obtuvo tanto de los pacientes como de los controles, de acuerdo a la declaración de Helsinki.

### **Muestras de sangre**

El plasma pobre en plaquetas (PPP) fue obtenido a partir de sangre anticoagulada con citrato de sodio 129 mmol/l y separado por centrifugación a 2500g durante 20 min. Con una centrifugación adicional a 13800g durante 10 min. se eliminó la posible contaminación plaquetaria residual. Las muestras se

guardaron a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación a 200g durante 10 min. Los anticoagulantes utilizados fueron los siguientes: EDTA 0.342 mol/L para citometría de flujo y para estudios de internalización, citrato trisódico 129 mmol/L para agregación plaquetaria, y ACD-C (7 mmol/L de ácido cítrico, 93 mmol/L de citrato, 139 mmol/L de dextrosa, pH 6.4) para estudios de fosforilación y RT-PCR. Para citometría de flujo y estudios de PCR, se adicionó indometacina 0.042 mol/L (Sigma, St Louis, MO, USA) para prevenir la activación plaquetaria. Para reducir la contaminación con leucocitos y glóbulos rojos, el PRP fue subsiguientemente centrifugado a 200g durante 5 min y filtrado a través de un filtro que permite eliminar leucocitos con alta eficiencia ( Purecell PL; Pall Biomedical Products, East Hills, NY, USA). Después de este procedimiento la relación leucocito: plaquetas fue menor de  $1:10^6$ . Las células mononucleares de sangre periférica y los granulocitos fueron recogidos a partir de sangre anticoagulada con EDTA 0.077 mol/L usando protocolos estándar.

### **Quimoquinas plasmáticas**

Los niveles plasmáticos de las quimoquinas IL-8, GRO-1 y SDF-1 fueron analizados por técnicas de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). Los valores normales fueron obtenidos de 19 controles y los mismos fueron similares a los publicados por los fabricantes. Los niveles de detección mínimos fueron de 2.8 pg/ml para IL-8, de 10 pg/mL para GRO-1 y de 18 pg/ml para SDF-1. Las muestras se analizaron por duplicado. Para evitar variaciones interensayo todas las muestras se analizaron en el mismo momento.

### **Citometría de flujo para CXCR1, CXCR2 y CXCR4**

El PRP se ajustó a  $10^8$  plaquetas/ml y se marcaron con cantidades saturantes de anticuerpos anti-CXCR1-FITC, CXCR2-FITC o CXCR4-PE (Becton-Dickinson, San José, CA, USA). Como control isotípico negativo se utilizaron anticuerpos monoclonales irrelevantes de la misma subclase de IgG. Se utilizó un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) para la identificación de plaquetas por su capacidad de unir anti-CD42b-PE o CD61-FITC (Becton-Dickinson). Para evaluar la expresión de CXCR4 sobre la membrana leucocitaria, las subpoblaciones de glóbulos blancos se individualizaron mediante la adición de MoAbs dirigidos contra CD45 marcados con PerCP y CD3 y CD14 marcados con FITC (Becton-Dickinson). Los valores se expresaron como la intensidad de fluorescencia relativa (RFI, tasa entre la intensidad de fluorescencia media de cada anticuerpo anti-CXCR y el correspondiente isotipo control). La relación entre RFI de pacientes y el correspondiente control normal (RFI-P/RFI-N) se calculó para buscar correlación entre la intensidad de marcación para el receptor CXCR4, el recuento plaquetario y los datos clínicos.

### **RT-PCR semicuantitativa para CXCR4**

Se partió de  $4 \times 10^9$  plaquetas para aislar RNA. Las plaquetas se lisaron con Trizol (Life Technologies, Bethesda, MD) y procesaron de acuerdo al protocolo de Chomczynski y Sacchi (25). La primera cadena de cDNA se sintetizó partiendo de 1ug RNA y de hexámeros al azar con el sistema de preamplificación Super-Script (Life Technologies). Para la amplificación de

CXCR4, la PCR se realizó con técnicas estándar usando Taq Polimerasa y 32 ciclos de 45 seg de desnaturalización a 94° C, una etapa de *annealing* de 45 seg. a 59° C y el paso de extensión durante 60 seg. a 72°C. Un fragmento de cDNA de CXCR4 fue amplificado con los siguientes primers F5'-TCATCAGTCTGGACCGCTA-3' y R 5'-TGCACAGTGTCTCAAACCTCA-3', (nt 481 al 937, GenBank N° de acceso NM\_003467) cuyo producto esperado es de 457 pb. Para la semicuantificación de CXCR4, se coamplificó GAPDH como control interno usando los siguientes oligonucleótidos: F5'-TGCACCACCAACTGCTT-3' y R 5'-TACTCCTTGGAGGCCAT-3' cuyo producto tiene 554 pb. Las muestras de cDNA se amplificaron en distintas diluciones para asegurar que la intensidad de bandas se corresponda con la región lineal de trabajo. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con posterior tinción con bromuro de etidio. La semicuantificación se llevó a cabo por análisis densitométrico de los productos amplificados utilizando un densitómetro de imágenes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### **Estudios de internalización de CXCR4**

Las plaquetas se ajustaron a  $1.5 \times 10^4$ /ml con medio IMDM y se estimularon con SDF-1 a una concentración de 1000 nmol/L durante 10 min a 37°C. Las muestras se lavaron y marcaron como previamente fue descrito con anti-CXCR4-PE y CD61-FITC. Muestras incubadas con IMDM sin el agregado de SDF-1 se consideraron como control negativo.

### **Estudios de agregación plaquetaria**

La agregación plaquetaria se evaluó por el método turbidimétrico como fue descrito por Born (26), utilizando un Lumi-agregómetro (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA). El PRP se ajustó a  $3 \times 10^8$ /ml y se estimuló con 10 a 100 nmol/L de SDF-1 (PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA) y/o 0.8 a 2.0  $\mu$ mol/L de ADP bajo agitación constante.

### **Estudios de fosforilación de proteínas**

Las plaquetas se filtraron en gradiente de metrizamida 10-25% como fue previamente descrito (27) y se resuspendieron a concentración final de  $5 \times 10^8$ /ml en buffer conteniendo 8.6 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.4 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 145 mmol/L NaCl, 11 mmol/L glucosa, pH 7.4, adicionando con fibrinógeno 1.84 mg/ml y  $\text{CaCl}_2$  0.922 mmol/L. Las plaquetas se incubaron con 200 ng/ml de SDF-1 durante 30 seg. y 5 min. La reacción se detuvo por adición de 50  $\mu$ l de SDS al 20%, PMSF 1 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, vanadato de sodio, 1 mmol/L, fluoruro de sodio 50 mmol/L, aprotinina 2  $\mu$ g/ml y leupeptina 2  $\mu$ g/ml. Finalmente las muestras se centrifugaron a 14000g durante 10 min y el sobrenadante se almacenó a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su uso. Para el inmunoblotting, 50  $\mu$ g de proteínas se sometieron a SDS-PAGE al 8% bajo condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Después del bloqueo de sitios de unión no específicos, las proteínas inmunoreactivas se incubaron con IgG de conejo antifosfotirosinas unidas a HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom). Después de lavados, la detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL; Amersham Pharmacia Biotech).



## **Análisis estadístico**

Los datos se presentaron como valores de mediana y rango. El test de suma de rangos de *Mann-Whitney-Wilcoxon* se utilizó para comparar variables entre pacientes y controles, y pacientes con y sin síntomas. El test de rangos señalados de *Wilcoxon* se usó para evaluar el nivel de receptores entre cada paciente y el control normal correspondiente evaluado el mismo día, evitando variaciones interensayo en la citometría de flujo y en estudios de RT-PCR. Se usó el test de Spearman para buscar si existía relación entre la expresión de CXCR4 y el recuento plaquetario. La significancia estadística fue definida como  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Niveles plasmáticos de las quimoquinas IL-8, GRO-1 y SDF-1

Se estudiaron los niveles de las quimoquinas IL-8, GRO-1 y SDF-1 en 19 pacientes con TE sin tratamiento. No encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los datos con los controles normales, estos fueron: para IL-8 de 2.5 pg/ml (0.8- 28.2) (mediana y rango) y de 2.8 pg/ml (1.1- 16.5), (pacientes y controles respectivamente), GRO-1, 30.0 pg/ml (7.4-463.1) y de 23.9 pg/ml (9.6-148); SDF-1 $\alpha$  1895 pg/ml (1246-2719) y 1915 pg/ml (822-2424).

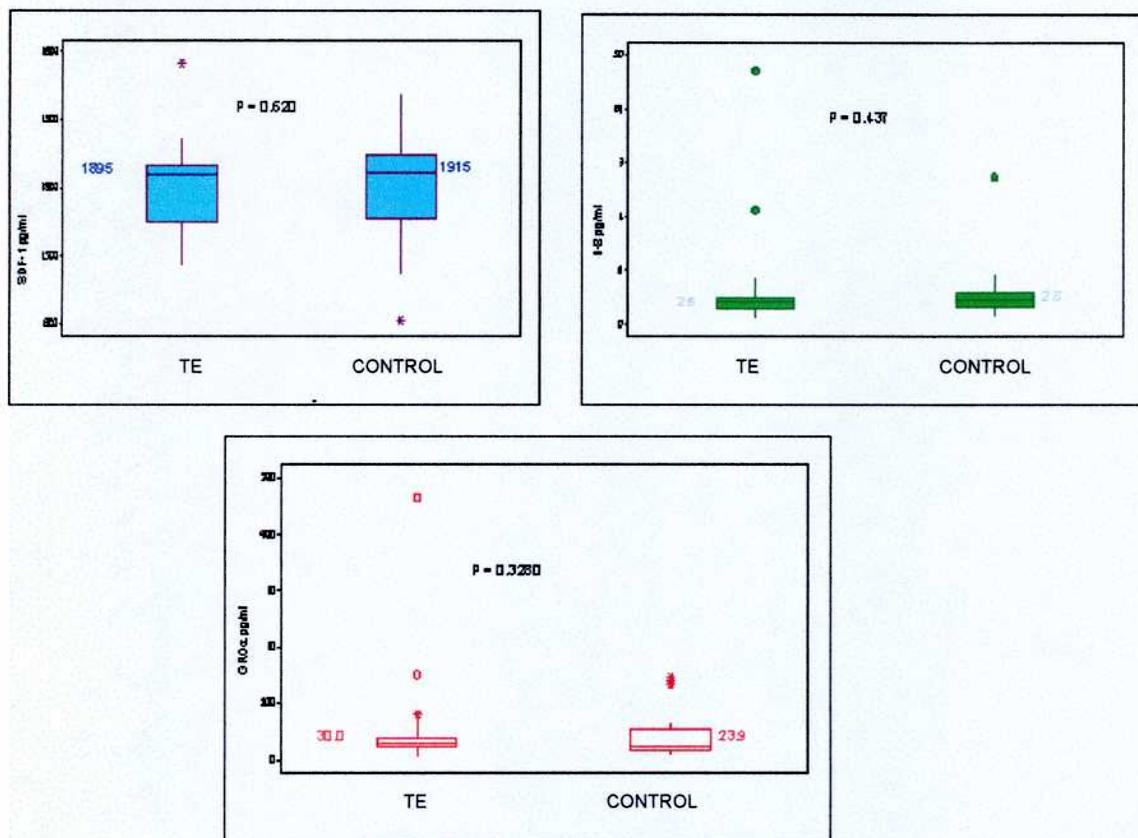
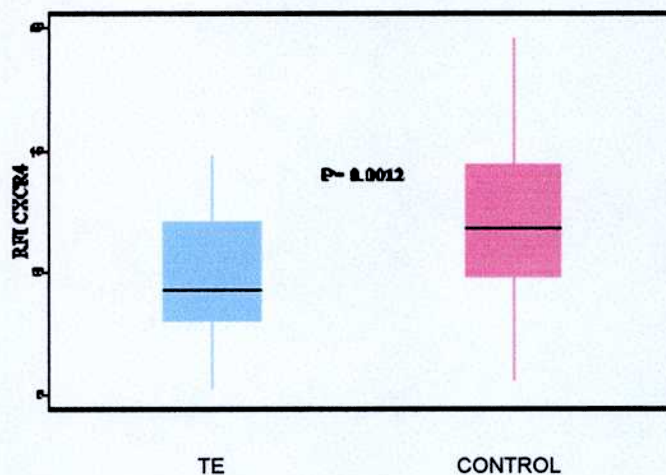


Fig. 7: diagramas de box que representan los valores plasmáticos obtenidos de la medición de las quimoquinas en circulación por técnica de ELISA. TE: pacientes con trombocitemia esencial. El analisis estadístico se realizó con el test de Mann-Whitney- Wilcoxon.

### CXCR4 sobre la superficie plaquetaria

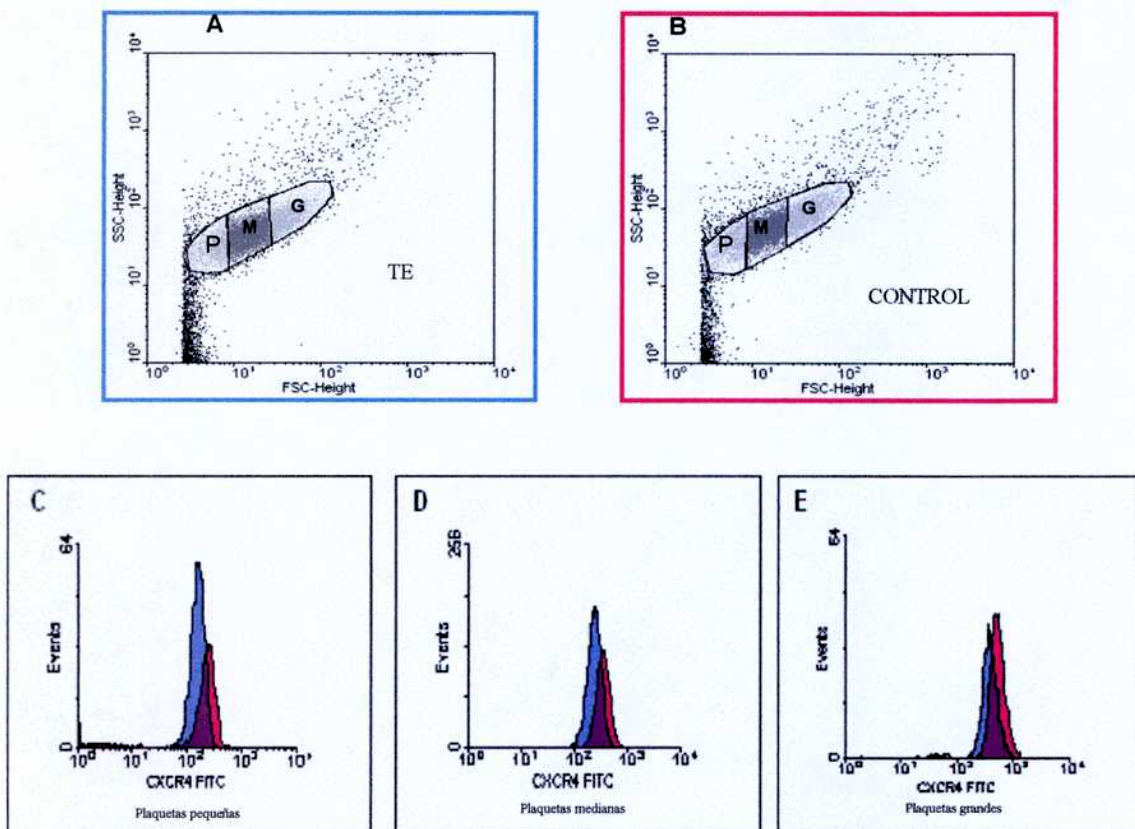
Para determinar el nivel de expresión de los receptores de quimoquinas en la superficie del principal linaje afectado en los pacientes con TE, se midieron los receptores para IL-8, GRO- $\alpha$  y SDF-1 en la membrana plaquetaria mediante citometría de flujo. Encontramos una disminución en la expresión de CXCR4 sobre la membrana de las plaquetas, RFI 17.6 (1.3-39.0), en 20 pacientes con TE comparados con los 20 controles normales, 27.4 (2.4-58.4),  $p= 0.0012$ , figura 8. Este grupo de pacientes comprenden 11 pacientes tratados con anagrelide, una imidazo-quinazolina utilizada para disminuir el recuento plaquetario, y 9 pacientes sin medicación. Cuando se analizaron separadamente, ambos grupos, mostraron resultados similares (pacientes sin tratamiento vs. controles normales,  $p=0.018$ , pacientes en tratamiento vs. controles normales,  $p=0.029$ ).



*Fig. 8: expresión de CXCR4 sobre la membrana plaquetaria de pacientes con TE y controles evaluados por citometría de flujo y expresados como intensidad de fluorescencia relativa (RFI). El análisis estadístico se realizó con el test de suma de rangos señalados de Wilcoxon.  $P=0.0012$ ,  $n=20$ .*

La expresión de los receptores CXCR1 y CXCR2 en la superficie plaquetaria de pacientes con TE fue normal, RFI 1.58 (1.33-1.78) y 1.43 (0.94-1.74), comparados con controles normales, RFI 1.57 (1.07-1.99) y 1.28 (1.01-1.47).

Para investigar si la disminución observada en los niveles de CXCR4 sobre la membrana plaquetaria estaba relacionada con el volumen plaquetario, las plaquetas se clasificaron de acuerdo a su tamaño en pequeñas, medianas y grandes. El RFI para CXCR4 estuvo disminuído en cada *subset* de plaquetas como se muestra en la figura 9.

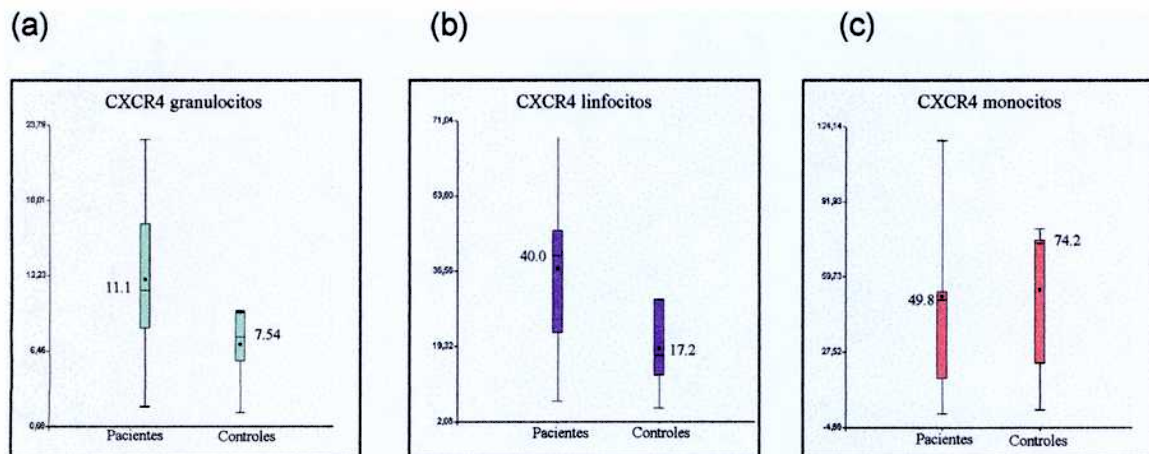


**Fig. 9:** ejemplo representativo de analisis de citometria de flujo del CXCR4 sobre la membrana plaquetaria de acuerdo al tamaño. Linea superior: logaritmo del forward scatter (ordenada) versus logaritmo del side scatter (absisa) para (A) paciente TE y (B) control. El gate se dibujó agrupando las subpoblaciones plaquetarias en pequeñas (P), medianas (M) y grandes(G). Linea inferior: conteo celular lineal (ordenada) versus el logaritmo de la fluoresceína CXCR4 (absisa). Trazados correspondientes a la fluorescencia plaquetaria obtenida en el paciente (histograma en lila) y en un control (en rosado) cuando se examinaron las subpoblaciones pequeñas (C), medianas (D) y grandes (E).

Los hallazgos clínicos en este grupo de 20 pacientes fueron los siguientes: el 50% asintomáticos y el resto tuvieron eventos trombóticos o microvasculares. Ningún paciente en este grupo tuvo manifestaciones hemorrágicas. No se hallaron diferencias en la expresión del CXCR4 en la membrana (relación RFI-Paciente/RFI-Normal) entre pacientes con y sin síntomas (suma de rangos de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p=0.39$ ). Además no hallamos correlación entre el recuento de plaquetas y los niveles de CXCR4 en los pacientes sin tratamiento (test de correlación de Spearman,  $r=-0.05$ ,  $p>0.5$ ).

### **CXCR4 sobre la superficie leucocitaria**

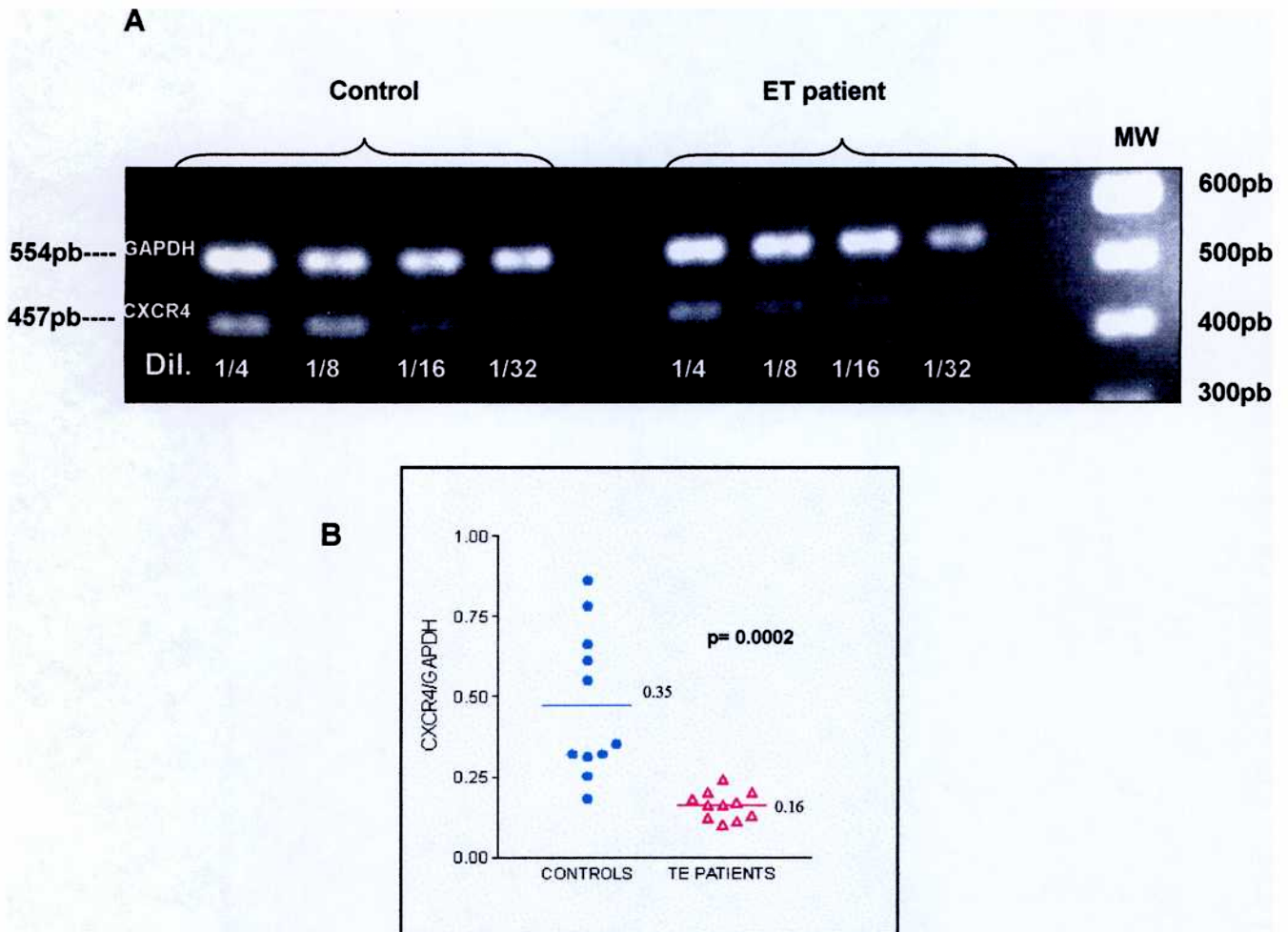
Con el objetivo de investigar si el linaje megacariocítico es el único afectado, medimos el nivel de receptor CXCR4 en leucocitos de sangre periférica de 7 pacientes y 7 controles. El RFI para CXCR4 en granulocitos de pacientes estuvo elevado, 11.1 (2.22-22.74) comparado con los controles normales, 7.54 (1.73-9.52),  $p=0.036$ . Resultados similares se hallaron para linfocitos CD3 positivos, pacientes 40.0 (6.78-67.91), controles 17.23 (5.22-29.97),  $p=0.036$ . Por el contrario, el CXCR4 sobre la membrana del monocito fue normal, RFI de pacientes, 49.81 (1.17-118.28), y controles normales, 74.23 (3.0-80.49),  $p=0.8$ .  
Figura 10 a-c.



*Fig. 10: Expresión del receptor CXCR4 por citometría de flujo sobre la superficie leucocitaria. El receptor CXCR4 sobre la membrana de granulocitos(a) y linfocitos (b) se halló aumentada (ambos,  $p=0.036$ ) en pacientes con TE, mientras que fue normal sobre la superficie de monocitos ( $n=7$ ) (c). Estos resultados indican que no hay otras células sanguíneas periféricas, además de las plaquetas, que presenten la reducción de la expresión del CXCR4.*

### **RNAm de CXCR4 en plaquetas**

Para determinar las posibles causas de la disminución en la expresión del receptor CXCR4 sobre la superficie plaquetaria, evaluamos los niveles del RNA mensajero en plaquetas de 11 pacientes sin tratamiento por técnicas de RT-PCR semicuantitativa. La relación entre los niveles de ARNm para CXCR4 y los niveles del gen constitutivo GAPDH en plaquetas de pacientes se encontró significativamente disminuido comparado con los controles, 0.16 (0.1-0.24) vs 0.35 (0.18-0.86), respectivamente,  $p=0.0002$ . Figuras 11 A y B.



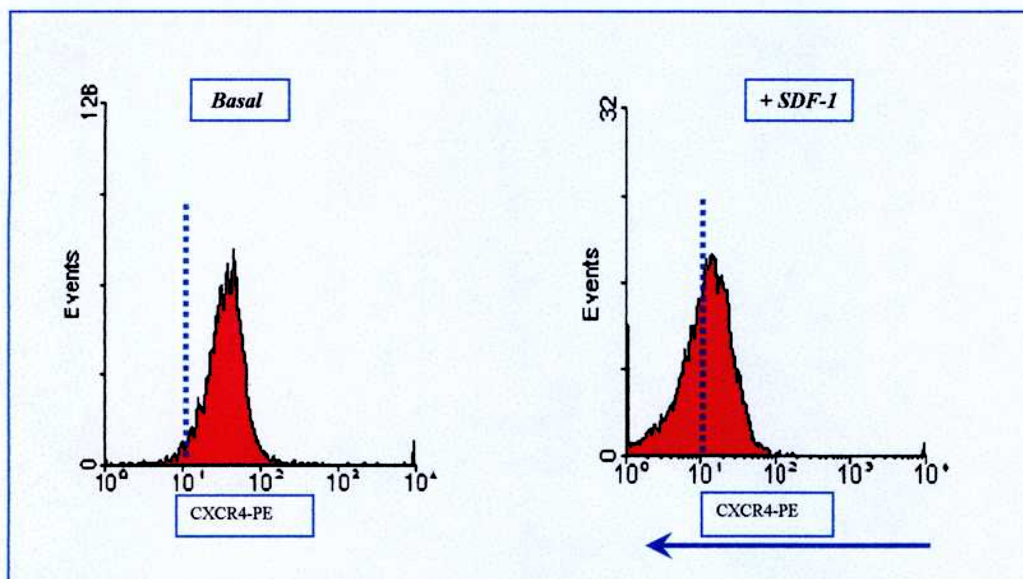
**Fig. 11:** Análisis de la RT-PCR semi-cuantitativa para CXCR4 plaquetario.

(A) Un ejemplo representativo de la expresión del ARNm para CXCR4 (banda inferior) y GAPDH (banda superior) en un control (izquierda) y en un paciente (derecha). Se evaluaron cuatro diluciones para cada cADN. (B) La relación CXCR4/GADPH en 11 controles y 11 pacientes con ET,  $P=0.0002$  (test de suma de rangos señalados de Wilcoxon).

### Internalización de CXCR4

Para investigar la funcionalidad del CXCR4 en los pacientes con TE, evaluamos la capacidad del receptor para internalizarse después de la unión del ligando específico SDF-1. El CXCR4 sobre la membrana plaquetaria fue evaluado por citometría de flujo después de la incubación con o sin 1000

nmol/L de SDF-1. Las plaquetas de 9 pacientes con TE y sus respectivos controles normales mostraron una tasa similar de internalización, 34.5% (26-44) y 30% (2-56), respectivamente.



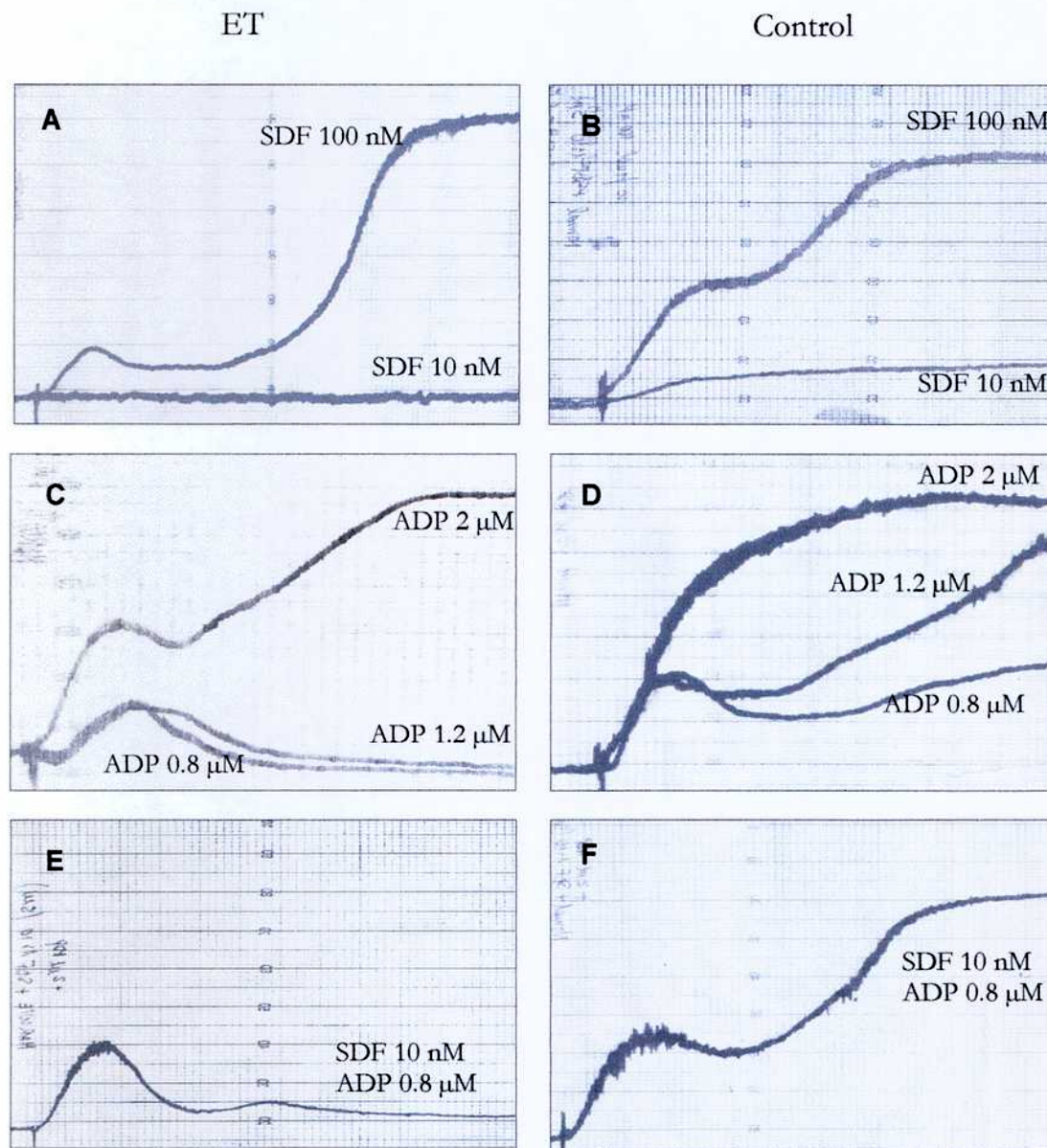
*Fig. 12: Se evaluó la capacidad del receptor para internalizarse cuando se unía al ligando SDF-1. El CXCR4 en la membrana fue medido por citometría de flujo después de la incubación con o sin la adición de SDF-1(derecha e izquierda respectivamente).*

### **Agregación plaquetaria con SDF-1**

Para evaluar las consecuencias funcionales de la disminución del CXCR4, probamos los efectos del SDF-1 en la agregación plaquetaria de los pacientes con TE. El SDF-1 induce en PRP de controles normales una agregación completa, bifásica, dosis dependiente. Por el contrario, en los pacientes observamos anomalías en la respuesta al SDF-1. Nuestros resultados muestran que la respuesta al SDF-1 en los pacientes con TE van en estrecho paralelismo con la respuesta al ADP. Dos de 6 pacientes evaluados no respondieron al SDF-1 ni al ADP. De los restantes cuatro, tres tuvieron un retraso en la aparición de la segunda onda de agregación inducida por SDF-1



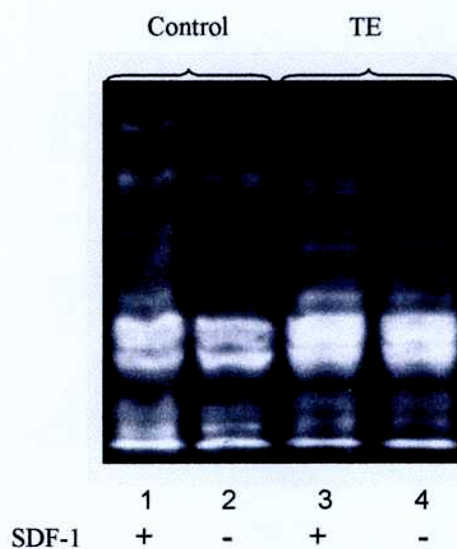
y el restante mostró solamente una primera onda de agregación. Esos pacientes tuvieron una respuesta normal al ADP cuando se usaron concentraciones estándar de 2  $\mu\text{mol/L}$ , sin embargo la respuesta estuvo disminuída comparada con los controles normales cuando la dosis usada fue subóptima (0.8 a 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ). Además, se observó un efecto sinérgico entre el ADP y el SDF-1 en todos los controles normales y solo en 1/3 pacientes con TE cuando ambos agonistas fueron añadidos simultáneamente. Un ejemplo representativo puede verse en la figura 13.



*Fig. 13: Agregación plaquetaria inducida por SDF-1 (A, B) y ADP.(C, D) y con ambos agonistas en concentraciones subóptimas agregadas simultáneamente (E, F). Un efecto sinérgico se muestra en F. En la columna de la izquierda se muestra la agregación de un paciente, en la de la derecha, un control normal.*

### **Fosforilación de tirosinas de proteínas plaquetarias inducida por SDF-1**

Se evaluó la fosforilación de tirosinas de proteínas de plaquetas filtradas en gradiente de metrizamide después de la estimulación con SDF-1. Se observó un patrón de proteínas fosforiladas en tirosinas a pesar de una completa ausencia de agregación plaquetaria. Pacientes y controles normales mostraron similares perfiles de activación, lo que sugeriría que no hay anomalías en la transducción de señal mediada por éste mecanismo. Puede verse un ejemplo en la figura 14.



*Fig. 14: Patrón de proteínas plaquetarias fosforiladas en tirosinas inducidas por 200 nmol/L de SDF-1 (líneas 1 y 3) en un control normal (izquierda) y en un paciente con TE (derecha). Las muestras no estimuladas se muestran en las líneas 2 y 4 respectivamente.*

## Discusión

En los últimos años una creciente cantidad de evidencia establece la participación de las quimoquinas en la megacariopoyesis y especialmente en la trombopoyesis. De interés particular es el hallazgo de que el SDF-1 incrementa la formación de plaquetas induciendo la migración transendotelial de megacariocitos (11, 16, 28). En el presente trabajo evaluamos los ejes de quimoquinas/receptores de quimoquinas en pacientes con TE, una enfermedad caracterizada por hiperplasia megacariocítica y elevado recuento plaquetario.

Los niveles plasmáticos de las quimoquinas activas en megacariocitos incluyendo IL-8, GRO-1 y SDF-1 se hallaron normales en los pacientes con TE. La quimoquina SDF-1 al unirse a su receptor CXCR4, una glicoproteína que atraviesa siete veces la membrana plasmática y está acoplado a proteína G, lleva a la internalización del mismo (29). Encontramos una disminución en los niveles de CXCR4 en la membrana plaquetaria de los pacientes con TE. Las causas de este hallazgo podrían ser: 1) un aumento en la tasa de internalización debida a un incremento en el estímulo ó 2) a una anomalía en el mecanismo de internalización del receptor. La primera hipótesis parece improbable ya que no hallamos niveles aumentados del SDF-1 en el plasma como se mencionó antes. La segunda fue descartada por estudios de internalización. 3) Otra posibilidad para la disminución del CXCR4 en la membrana plaquetaria es la reducción de su producción. Asumiendo que el RNAm plaquetario refleja el del megacariocito, el hallazgo de una disminución en los niveles de expresión del mensajero apoya fuertemente esto último. La sostenida reducción de las cantidades de transcritos podría indicar la

activación de un mecanismo de represión de la transcripción o bien una reducida estabilidad del mensajero de CXCR4.

Se describió que normalmente la expresión del CXCR4 va incrementándose durante el desarrollo megacariocítico (30). No obstante, también se ha probado que hay una progresiva desensibilización para el SDF-1, sugiriendo una disociación entre la expresión y la función (13) a lo largo del desarrollo del progenitor. Este fenómeno puede explicarse por el aumento de la expresión del RGS16, un regulador negativo de la señal inducida por proteína G asociada al eje SDF-1/CXCR4, durante la megacariopoyesis (31). Además, Shen et al (32) reportaron que a pesar de los bajos niveles de CXCR4, las células CD34+ de médula ósea muestran proporcionalmente una mayor respuesta al SDF-1 que las CD34+ que se encuentran en sangre periférica, demostrando la disociación antes mencionada también en estas células progenitoras. Basados en esta divergencia, se propuso comprobar las consecuencias funcionales de la disminución del CXCR4 en los pacientes con TE. Con este objetivo, evaluamos la agregación plaquetaria inducida por SDF-1. Los pacientes muestran una anormal respuesta caracterizada por un retraso o ausencia de segunda onda de agregación o aún una ausencia de respuesta. Es interesante el hecho de que la inducción de agregación por SDF-1 va en estrecho paralelismo con la del ADP. La alteración de la agregación plaquetaria por ADP es un defecto bien conocido en los pacientes con TE y en otros desordenes mieloproliferativos crónicos (33, 34). Así, el 41% de los pacientes con TE estudiados en nuestro laboratorio desde el año 1992 muestra esta anormalidad (35). Se demostró que bajas dosis de agonistas tales como el ADP presentes en el PRP en condiciones normales, son necesarias para producir activación plaquetaria

completa inducida por SDF-1. La disminución de la expresión de CXCR4 en pacientes con TE podría contribuir a una anormal agregación inducida por SDF-1. Sin embargo, el estrecho paralelismo en la respuesta ejercida por el ADP y el SDF-1 pueden sugerir que la agregación inducida por éste último es un fenómeno ADP-dependiente.

Hallamos que la fosforilación en tirosinas de las proteínas plaquetarias obtenidas por gradiente de metrizamide se modifica cuando las plaquetas son estimuladas con SDF-1 (36). El patrón de fosforilación fue similar en pacientes y controles normales en las condiciones experimentales a pesar de la anormal agregación plaquetaria demostrada en los pacientes en estudios con PRP. Por lo tanto, tendemos a pensar que las diferencias observadas en los estudios de agregación entre pacientes y controles estarían más relacionados a una disminución del CXCR4 y/o a un defecto en la respuesta al ADP que a una alteración de las vías de transducción inducidas por el agonista.

Además de la disminución del CXCR4, se han descrito disminución en una variedad de receptores en éstos pacientes, tales como c-mpl, receptores de prostaglandina D2, glicoproteínas Ib y complejo glicoproteico IIb/IIIa (37-39). Por lo tanto, es posible que las anormalidades moleculares involucradas en el desarrollo de la TE estén relacionadas con la regulación de varios productos génicos en megacariocitos, incluyendo CXCR4. El hecho de que el CXCR4 permanezca disminuído durante la normalización del recuento plaquetario en los pacientes en tratamiento con anagrelide apoya esta última hipótesis.

Liles et al (40) demostraron que el bloqueo de CXCR4 lleva a un incremento del egreso de células progenitoras desde la medula ósea a la sangre periférica, demostrando que la disfunción en el eje CXCR4/SDF-1 permite a los

progenitores perder el anclaje al estroma medular. Podría hipotetizarse que la disminución del CXCR4 observada en las plaquetas de los pacientes puede ser reflejo de la de los megacariocitos. Si este fuese el caso, esta disminución podría aumentar la relocalización de éstas células desde el estroma medular al nicho vascular donde la producción plaquetaria está favorecida. Están en progreso estudios para clarificar esto último.

Alternativamente, basados en el hecho de que el SDF-1 favorece la producción plaquetaria, induce quimiotaxis y adhesión a la célula endotelial, la disminución del CXCR4 observada en los pacientes podría representar un mecanismo para contrabalancear la sobreproducción plaquetaria.

Los estudios de citometría de flujo sobre subpoblaciones leucocitarias demuestran que la disminución del CXCR4 está restringida al linaje megacariocítico. Inesperadamente, la expresión del CXCR4 en linfocitos y neutrófilos de pacientes se encontró aumentada. Serán necesarios más estudios para aclarar este asunto.

En conclusión, los resultados aquí presentados muestran una desregulación en el eje SDF-1/CXCR4 en plaquetas de pacientes con TE. Además, la participación de éste en la megacariopoyesis y trombopoyesis convierte este hallazgo en un hecho relevante en la TE, una enfermedad que afecta exclusivamente al linaje megacariocítico.

## Referencias

1. Tavassoli M.. The marrow- blood barrier. *Br J Haematol* 1979, 41:297-302.
2. Yin T.,Li L.The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1195-201.
3. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3:1717-24.
4. Han ZC, Bellucci S, Caen JP. Megakaryocytopoiesis: characterization and regulation in normal and pathologic states. *Int J Hematol.* 1991 Feb;54: 3-14.
5. Barret J. Rollins. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928.
6. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines y chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354: 610-621.
7. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate y adaptive immunity. *Invest Dermatol.* 2005; 125: 615-628.
8. Baggiolini M.. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998, 392: 565-568.
9. Gewirtz Alan M, Zhang Jin, Ratajczak Janina, Ratajczak Mariusz, Sook Park Kwang, Li Changqing, Yan Zhanqing, Poncz Mortimer. *Blood.* 1995; 7: 2559-2567.
10. Wang JF, Liu ZY, Gropman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998; 92: 756-764
11. Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J et al. Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med* 1998; 188: 539-548.

12. Kowalska M, Ratajczak J, Hoxie J, et al. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes y platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes y platelets. *Br J Haematol* 1999; 104: 220-229.
13. Riviere C, Subra F, Cohen-Solal K, et al. Phenotypic y functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood* 1999; 93: 1511-1523.
14. Gear AR, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, y SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 2001; 97: 937-945.
15. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2000; 86:131-138.
16. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine* 2004; 10: 64-71
17. Tefferi A, Murphy S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, y management. *Blood Rev* 2001; 15: 121-131.
18. Harrison CN. Essential thrombocythemia: challenges y evidence-based management. *Br J Haematol* 2005; 130: 153-165.
19. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia vera study group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, y leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997; 34: 29-39



20. Baxter A, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
21. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, y myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
22. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
23. Emadi S, Clay D, Desterke C, et al. IL-8 y its CXCR1 y CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation y ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood* 2004; 105: 464-473.
24. Hermouet S, Godard A, Pineau D, et al. Abnormal production of interleukin (IL)-11 y IL- 8 in polycythaemia vera. *Cytokine* 2002; 20: 178-183.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol—chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987; 162: 156–159.
26. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate y its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-929.
27. Levy-Toledano S, Bredoux R, Rendu F, Jenneaux C, Savarian E, Dassin E. Isolation y function of platelets. I. Platelet rich plasma. Comparison between 2 methods: gel filtration y albumin density gradient centrifugation. II. A new method using total blood: metrizamide gradient centrifugation. *Nouv Rev Fr Hematol* 1976; 16: 367-374.

28. Gerreiro R, Mattia G, Testa U, et al. Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001; 97: 2587-2595.
29. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin y blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833.
30. Secchiero P, Celeghini C, Cutroneo G, Di Baldassarre A, Rana R, Zauli G. Differential effects of stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) on early y late stages of human megakaryocytic development. *Anat Rec* 2000; 260:141-147.
31. Berthebaud M, Riviere C, Jarrier P, et al. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* 2005; 106:2962-2968.
32. Shen H, Chen T, Olszak I y col. CXCR4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells *J Immunol* 2001; 166: 5027-5033.
33. Cortelazzo S, Viero P, Bassan R, Barbui T. Spectrum of platelet aggregation abnormalities in myeloproliferative diseases. *Ric Clin Lab* 1981; 11: 35-42.
34. Cesar JM, de Miguel D, Garcia Avello A, Burgaleta C. Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, PFA-100. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 772-7.
35. Vasallu P, Goette N, Glembotsky A, Heller P, Kornblihtt L, Lev P, Chazarreta D, Salim J, Laguna M, Marta R, Molinas F. Evolucion de las manifestaciones clinicas y pruebas de funcion plaquetaria en pacientes con trombocitemia esencial tratados con anagrelide. *Medicina* 2005; 65 (Supl.II): 174 abst 12690.

36. Gear A, Camerini D. Platelet chemokines y chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, y host defense. *Microcirculation* 2003; 10: 335–350.
37. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, et al. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997; 90:4031-4038.
38. Cooper B, Schafer AI, Puchalsky D, Handin RI. Platelet resistance to prostaglandin D2 in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1978; 52: 618-626.
39. Mazzucato M, De Marco L, De Angelis V, De Roia D, Bizzaro N, Casonato A. Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative disorders: decrease in glycoproteins Ib y IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function. *Br J Haematol* 1989; 73: 369-74.
40. Liles WC, Broxmeyer E, Rodger B, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 2003; 102: 2728-2730.