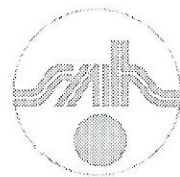


Citoquinas y quemoquinas en trombocitemia esencial

Marta Rosana F.



ARTÍCULO
ESPECIAL

*Sección Hematología Investigación,
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA,
Unidad Ejecutora IDIM-CONICET.*

Fecha de recepción: 15/2/07

Fecha de aceptación: 1/3/07

HEMATOLOGIA, Vol. 10 N° 3: 80-83
Setiembre-Diciembre, 2006

La trombocitemia esencial (TE), junto con la policitemia vera y la mielofibrosis con metaplasia mieloide, comprenden un grupo de enfermedades denominadas síndromes mieloproliferativos crónicos Filadelfia negativos. Estas tres entidades comparten algunas características clínicas aunque difieren en su historia natural y en sus requerimientos terapéuticos¹. Las características que definen a la TE son hiperplasia de megacariocitos y trombocitosis sostenida. Además, el diagnóstico de esta patología debe realizarse por exclusión de las otras enfermedades mieloproliferativas y de estados asociados a trombocitosis reactiva.

La megacariocitopoyesis es un complejo proceso en el cual una célula madre se compromete con este linaje, prolifera y madura para producir megacariocitos poliploides con abundante citoplasma, a partir del cual se generan plaquetas, eliminándose por último el núcleo remanente. Estos procesos son regulados por factores de transcripción y por citoquinas presentes en el medio extracelular² (Fig. 1). La principal citoquina que actúa regulando la megacariocitopoyesis es la trombopoyetina (Tpo) que ejerce su efecto sobre los progenitores no comprometidos, los precursores durante la etapa de proliferación y las células ya diferenciadas.

El hígado en primer lugar y en menor medida el riñón y las células del estroma de médula ósea, producen cantidades constantes de Tpo que se liberan a

circulación. Los niveles de esta citoquina en sangre periférica en el estado estacionario se regulan mediante su unión al receptor específico c-Mpl que se encuentra en megacariocitos y plaquetas, con la posterior internalización y degradación del ligando. Cuando la masa total de c-Mpl aumenta por aumento de los niveles de plaquetas en sangre periférica, la Tpo plasmática disminuye. Contrariamente, cuando el recuento de plaquetas disminuye y con él la cantidad total de receptor c-Mpl, la Tpo plasmática aumenta. Existen, además, algunas situaciones particulares en las que los niveles de Tpo se ven modificados por otras variables. Ejemplo de esto son los estados inflamatorios en los que las células que participan, como el sistema monocito-macrofágico y los fibroblastos, producen citoquinas inflamatorias como el TNF y la IL-6. Esta última actúa estimulando la síntesis hepática de distintas moléculas, entre ellas la de Tpo. Otra de las situaciones en que la regulación de la Tpo está alterada es en la trombocitemia esencial (TE). Al contrario de lo que se esperaría, los pacientes con TE presentan niveles normales o ligeramente aumentados de Tpo en sangre periférica, en coincidencia con un recuento de plaquetas y de megacariocitos aumentado³⁻⁵. Se ha descrito que los niveles de c-Mpl se encuentran disminuidos en pacientes con TE, hecho que podría ser la causa de los niveles ligeramente elevados de Tpo⁶. Aunque los valores de Tpo medidos en un subgrupo de pacientes elegidos

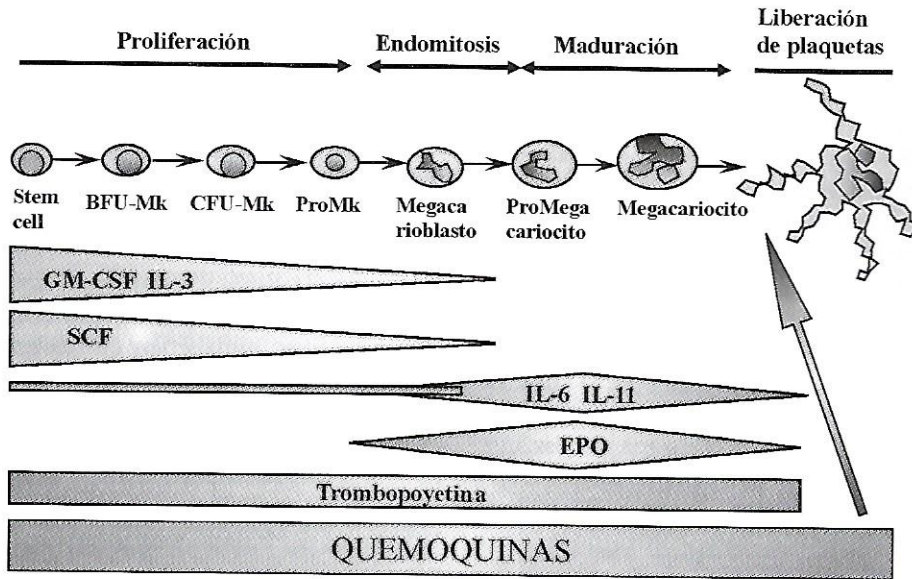


Fig. 1.- Esquema de la megacariocitopoyesis y trombopoyesis con los mediadores solubles que intervienen.

al azar durante el tratamiento no difirió estadísticamente de los valores pre tratamiento, se observó una tendencia al aumento de Tpo con el tratamiento³. Esto indica que al corregir el número de plaquetas, lo que equivale a disminuir la cantidad total de células que poseen el receptor c-mpl, el nivel de Tpo aumenta, apoyando la hipótesis de este mecanismo regulatorio.

Se ha descrito que la Tpo induce activación plaquetaria en altas concentraciones. De particular interés resulta el hecho de que los pacientes sin tratamiento que presentaron agregación espontánea tuvieron valores de Tpo mayores que los que no la presentaron³. Este hallazgo podría sugerir que los niveles más altos de Tpo jugarían un rol en la activación plaquetaria en pacientes con TE, puesta de manifiesto en la aparición de agregación espontánea *in vitro*. Sin embargo, durante la remisión hematológica, cuando el recuento plaquetario se encuentra dentro de niveles normales y el nivel de Tpo aumenta, la agregación espontánea desaparece. Por lo tanto, parece evidente que la trombocitosis es un factor decisivo en la aparición de agregación espontánea y que el nivel de Tpo sería un factor adicional que favorecería la aparición de activación plaquetaria *ex vivo*.

Otras citoquinas con demostrado efecto estimulante de la proliferación de los progenitores megacariocíticos son la SCF, la IL-3 y GM-CSF. A diferencia de la Tpo, que actúa a lo largo de toda la megacariocitopoyesis, éstas actúan sobre las etapas tempranas del desarrollo megacariocítico. Los estudios realizados en nuestro laboratorio en pacientes con TE indi-

can que los niveles plasmáticos de SCF y GM-CSF son normales. En cambio, el 25% de los pacientes tuvieron aumento del nivel de IL-3 siendo la mediana estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Un importante dato para entender la causa de las alteraciones que originan esta patología es el hecho de que los progenitores hematopoyéticos presentan un aumento de la sensibilidad a citoquinas como Tpo e IL-3⁷⁻⁹. Sin embargo, el agregado de anticuerpos neutralizantes contra IL-3 no inhiben la formación de colonias megacariocíticas espontáneas¹⁰. Recientemente se ha descrito la presencia de una mutación puntual V617F en la tirosinaquinasa JAK2 en pacientes con desórdenes mieloproliferativos crónicos¹¹⁻¹². Esta mutación llevaría a la activación constitutiva de la enzima, que participa en la traducción de señal intracelular de varias de las citoquinas involucradas en la megacariocitopoyesis incluyendo la Tpo, IL-3, Epo e IL-6, otorgando a las células que la poseen una ventaja proliferativa frente a las que poseen la enzima normal. Esta mutación podría explicar la hipersensibilidad o aún la independencia a citoquinas desarrollada por los progenitores en estos pacientes. Sin embargo, estos hallazgos no parecen clarificar la etiología de la trombocitemia esencial ya que el porcentaje de pacientes que presentan la mutación V617F varía entre 23 y 57%. En nuestro grupo de pacientes, los niveles de IL-3 no tuvieron relación con el recuento de glóbulos blancos, con el de las distintas subpoblaciones leucocitarias, ni con el de plaquetas. Tampoco se encontró diferencias en cuanto a la presencia de la mutación de JAK2 ni a las ma-

nifestaciones clínicas entre el grupo con niveles de IL-3 normal y aumentada. Ya que los pacientes con TE representan un grupo heterogéneo en relación con varios parámetros como por ejemplo, niveles de RNA mensajero de PRV-1, clonalidad o presencia de mutaciones, este aumento de IL-3 podría ser un factor más, que conduce a la hiperproliferación de megacariocitos en este grupo de pacientes.

Dentro de las citoquinas que participan en la megacariopoyesis también se encuentran la IL-6, IL-11 y la eritropoyetina (Epo). Estas tienen efecto principalmente en la etapa de diferenciación pero también participan en la de proliferación.

A diferencia de lo reportado por otros grupos, que encuentran valores disminuidos de eritropoyetina circulante, en un grupo de 10 pacientes con TE evaluados en nuestro laboratorio, se encontraron niveles normales de Epo. Del mismo modo, los niveles de IL-6 e IL-11 fueron normales. Estas últimas pertenecen a la familia de citoquinas que traducen la señal a través de la gp 130, molécula que se activa cuando la citoquina se une a su receptor específico. En particular, la IL-6 induce la activación de la señal intracelular de la siguiente forma: el receptor específico de la citoquina no tiene capacidad de traducción de señal por sí mismo, sino que cuando se une a su ligando produce la homodimerización de la glicoproteína 130 formando un pentámero compuesto por el ligando, dos moléculas del receptor específico y dos de la gp130. Esto desencadena la activación de segundos mensajeros y factores de transcripción como JAK2 y STAT, induciendo la translocación de este último al núcleo y activando la transcripción de genes blancos de esta citoquina. El receptor de membrana específico para IL-6 se encuentra en algunos tipos celulares como células B y hepatocitos, en cambio la gp130 es ubicua. Existe además una fracción soluble del receptor de IL-6 (IL-6sR) que retiene la capacidad de activar a la gp130 cuando se encuentra unida a la IL-6. Esto transforma a las células que no poseen el receptor específico de IL-6 en sensibles a esta citoquina. Este es el caso, por ejemplo, de las células endoteliales y en nuestra experiencia, la de los progenitores medulares CD34+ (13).

Nosotros encontramos que el 50% de los pacientes con TE presentan aumento del IL-6sR en sangre periférica¹⁴. Esto podría sugerir un aumento de la sensibilidad a IL-6 en estos pacientes. Para tratar de averiguar la fuente del aumento del IL-6sR estudiamos el IL-6sR presente dentro de las plaquetas y encontramos que los pacientes tienen menor cantidad de IL-6sR intraplaquetario que los controles, lo que sugeriría que parte del aumento de IL-6sR en el plasma podría provenir de las plaquetas durante su activación *in vivo*. Además, el IL-6sR liberado por las células

mononucleares de sangre periférica de pacientes con TE en cultivo fue mayor que en los normales, por lo tanto, éstas células también podrían ser una fuente del aumento del receptor en circulación.

Otras citoquinas relacionadas con la regulación de la megacariopoyesis normal y con el desarrollo de mielofibrosis son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (β FGF) que se sintetizan en los megacariocitos y se almacenan en los gránulos de las plaquetas^{2,15-17}. Nuestro grupo realizó la evaluación de estas citoquinas en pacientes con TE antes y durante el tratamiento con anagrelide, una imidazoquinazolina utilizada para reducir el recuento plaquetario^{18,19}. El nivel plasmático de PDGF estuvo aumentado antes del tratamiento, junto con disminución del nivel proteico intraplaquetario y de su correspondiente RNA mensajero, lo que sugeriría que la disminución del PDGF intraplaquetario puede deberse a liberación de las plaquetas al activarse *in vivo* y de una disminución en la síntesis. Además, se encontró una asociación entre niveles elevados de PDGF plasmático y fibrosis reticulínica en estos pacientes. Durante el tratamiento, el nivel plasmático se normaliza, así como la proteína intraplaquetaria, lo que sugiere que la activación plaquetaria con la consiguiente liberación del contenido de gránulos se revierte. Sin embargo, el RNA mensajero del PDGF continúa disminuido, evidenciando una alteración molecular subyacente. El TGF- β plasmático estuvo aumentado antes y durante el tratamiento, con niveles proteicos intraplaquetarios normales en ambos casos, lo que induce a pensar en otra fuente celular que origine su aumento en plasma. Por otro lado, el RNA mensajero se encontró aumentado dentro de la plaqueta, lo que demuestra una desregulación transcripcional o en la estabilidad del mensajero. Por último, tanto el β FGF plasmático como el intraplaquetario estuvieron aumentados antes del tratamiento, disminuyendo, aunque no hasta valores normales, durante el tratamiento. El RNA mensajero fue normal en ambas situaciones, sugiriendo otras fuentes celulares para esta proteína en el plasma y una posible alteración postranscripcional a nivel plaquetario. En conjunto estos datos revelan que estas citoquinas no presentan un perfil similar, ni en plasma ni en plaquetas, sugiriendo que los mecanismos responsables de su regulación son múltiples e independientes entre sí.

En los últimos años se ha comenzado a dilucidar la participación de ciertas quimioquinas en la última etapa de la megacariocitopoyesis relacionada con la producción de plaquetas. Avcilla y colaboradores demostraron que el factor derivado de estroma 1 (SDF-1) y el FGF-4 inducen la interacción de los

megacariocitos con el nicho vascular, favoreciendo la producción plaquetaria²⁰. En nuestro laboratorio se ha comenzado con el estudio de algunas de las quimioquinas con posible acción sobre la megacariopoiesis y trombopoiesis en TE. Estudios preliminares demuestran que los niveles de SDF-1, GRO- α e IL-8 en estos pacientes son normales, pero que el receptor CXCR4, único receptor descrito para el SDF-1, se encuentra disminuido en la membrana de las plaquetas en estos pacientes²¹. Los estudios en curso intentan clarificar la causa de esta disminución y su consecuencia funcional en esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

- Harrison CN, Green AR. Essential thrombocythaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2006; 19: 439-453.
- Deutsch V, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006; 134: 453-466.
- Marta RF, Goette NP, Molinas FC. Niveles de citoquinas megacariocitopoyéticas en pacientes con trombocitemia esencial y su relación con características clínicas y bioquímicas. *Medicina* 2006; 66: 540-546.
- Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini C. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1997; 99: 281-284.
- Tahara T, Usuki K, Sato H, y col. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996; 93: 783-788.
- Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, et al. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997; 90: 4031-4038.
- Axelrad A, Eskinazi D, Correa P, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000; 96: 3310-3321.
- Kawasaki H, Nakano T, Kohdera U, Kobayashi Y. Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2001; 68: 194-197.
- Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H. Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol* 1993; 83: 539-544.
- Li Y, Hetet G, Maurer A, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Br J Haematol* 1994; 87: 471-476.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- 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.
- Chazarreta D, Marta R, Goette N, Molinas F. Receptor soluble de IL-6 y su efecto protector sobre la muerte de las stem cells hematopoyéticas. *Medicina* 2005; 65 (Sup 1. II):174 abst.
- Marta RF, Goette NP, Lev PR, et al. Increased levels of plasma interleukin-6 soluble receptor in patients with essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004; 89: 657-663.
- Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MAS. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood* 1981; 57: 781-787.
- Martyré MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, y col. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997; 97: 441-448.
- Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood* 1994; 83: 2126-2132.
- Lev PR, Marta RF, Vassallu P, Molinas FC. Variation of PDGF, TGF- β and bFGF levels in essential thrombocythemia patients treated with anagrelide. *Am J Hematol* 2002; 70: 85-90.
- Lev PR, Salim JP, Kornblihtt LI, et al. PDGF-A, PDGF-B, TGF- β and bFGF mRNA levels in patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Am J Hematol* 2005; 78: 155-157.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 2004; 10: 64-71.
- Salim JP, Marta RF, Molinas FC. Megakaryocyte-active chemokines: dysregulation in the SDF-1 α /CXCR4 axis in patients with essential thrombocythemia. *Blood* 2005; 106: 323 abst.