

Patogenia de la trombosis en neoplasias mieloproliferativas ¿existen marcadores predictivos?

Mechanisms underlying thrombosis predisposition in myeloproliferative neoplasms: are predictive markers available?

Heller PG

División Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires. UE IDIM-CONICET.

paulaheller@hotmail.com



ASPECTOS DE INTERÉS EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS PH NEGATIVAS

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 N° Extraordinario: 362-366
XXIII Congreso Argentino de Hematología
Noviembre 2017

Palabras claves: neoplasias mieloproliferativas, trombosis, JAK2, CALR, trampas extracelulares de neutrófilos.

Keywords: myeloproliferative neoplasms, thrombosis, JAK2, CALR, neutrophil extracellular traps.

La trombosis es la complicación más frecuente en los pacientes con neoplasias mieloproliferativas (NMP) y la primera causa de mortalidad. Ocurre en alrededor del 20-30% de los pacientes con policitemia vera y trombocitemia esencial, siendo la frecuencia algo menor en mielofibrosis, de aproximadamente 10-15%⁽¹⁾. Los eventos pueden ser arteriales o, menos frecuentemente, venosos y entre éstos se destacan las trombosis esplácnicas. Por otra parte, son muy prevalentes las alteraciones de la microcirculación, como eritromelalgia o fotopsias, especialmente en trombocitemia esencial, ocasionadas por la formación de agregados plaquetarios transitorios en los pequeños vasos. El tratamiento citorreductor en estas patologías se dirige funda-

mentalmente a prevenir el desarrollo de trombosis e incluye la hidroxiurea, el interferón alfa y el anagrelido, entre otros. Dado que ninguno de ellos está desprovisto de efectos adversos, están indicados en los pacientes con mayor riesgo trombótico. Por este motivo, los pacientes se clasifican en grupos de riesgo trombótico en los cuales se basa la toma de decisiones terapéuticas. Determinar cuáles son los pacientes de mayor riesgo trombótico es fundamental para definir la conducta terapéutica.

Factores de riesgo trombótico

Los únicos dos factores claramente establecidos sobre los cuales se basa la indicación terapéutica son la edad mayor a 60 años y el antecedente trombótico⁽¹⁾.

Por otra parte, la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos, como tabaquismo, diabetes, hipertensión arterial y dislipidemia, aumentan el riesgo de trombosis. Otro factor que influye es el perfil mutacional. La relación de la presencia de la mutación JAK2 V617F en trombocitemia esencial con el riesgo trombótico fue evaluada en diversos estudios. En ciertos estudios iniciales, incluido el llevado a cabo por nuestro grupo, se demostró una mayor frecuencia de trombosis en los pacientes portadores de la mutación^(2,3), mientras que en otros, no hubo diferencia entre los pacientes positivos y negativos. Esta controversia fue resuelta mediante un metaanálisis⁽⁴⁾, que estableció que la presencia de la mutación aumenta el riesgo trombótico aproximadamente al doble. También existe una relación entre carga alélica de la mutación JAK2V617F y trombosis⁽⁵⁾, aunque el valor de este parámetro en la toma de decisiones clínicas no ha sido establecido.

En base a estos 4 factores, incluyendo edad, trombosis previa, factores de riesgo cardiovascular y mutación JAK2 V617F, se ha propuesto una escala de riesgo denominada IPSET-trombosis⁽⁶⁾. En base a este modelo, los pacientes se categorizan en 3 grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto. Sin embargo, esta escala aún no se utiliza en la práctica clínica. A partir de la identificación de las mutaciones en el gen de calreticulina (CALR), se demostró que los pacientes CALR-positivos presentan menor riesgo trombótico comparados con los JAK2-positivos y los MPL-positivos⁽⁷⁾.

Los mecanismos del estado protrombótico existente en estas neoplasias son complejos y múltiples.

Rol de las células sanguíneas

En policitemia vera el aumento del hematocrito influye en el riesgo trombótico y está bien establecido que es beneficioso mantener cifras de hematocrito inferiores a 45%⁽⁸⁾. En este sentido la hiperviscosidad es en parte responsable del efecto del hematocrito en la trombosis, pero además un trabajo reciente mostró que el aumento del hematocrito induce un aumento en la acumulación de plaquetas en sitios de injuria vascular, favoreciendo la formación del trombo arterial por un efecto mecánico, al “empujar” a las plaquetas hacia la pared vascular⁽⁹⁾. Por otra parte, si bien es indudable que el aumento de plaquetas juega un rol en la trombosis, lo que se evidencia por la prevención de los eventos trombóticos

al normalizar las cifras de plaquetas, no existe una relación directa entre recuento de plaquetas y frecuencia de trombosis. Más aún, la trombocitosis extrema (recuentos mayores a un millón o un millón y medio) se asocian a menor frecuencia trombótica y mayor riesgo hemorrágico, debido al consumo de factor von Willebrand de alto peso molecular⁽¹⁰⁾.

Más recientemente se ha puesto en evidencia la importancia de la leucocitosis como factor de riesgo trombótico. Los niveles de corte considerados varían en diferentes estudios, siendo evidente que existe una relación directa entre recuento de leucocitos y trombosis⁽¹¹⁾.

Estado hipercoagulable en neoplasias mieloproliferativas

No solamente las anomalías cuantitativas de las células influyen en la trombosis, sino que también existen alteraciones cualitativas que impactan en el mismo, ya que tanto los leucocitos como las plaquetas circulan en estado activado, presentando cambios hacia un fenotipo protrombótico. Las células activadas liberan mediadores procoagulantes, expresan moléculas de adhesión, que favorecen su interacción con otras células y con el endotelio, retroalimentando el circuito de activación celular plaqueta-leucocito-endotelio. Por otra parte, coexistiendo con el clon mieloproliferativo se desarrolla una reacción inflamatoria sistémica, manifestada por el aumento de una serie de citoquinas inflamatorias circulantes que gatillan mayor activación celular y endotelial, exacerbando el estado hipercoagulable^(12,13). La activación celular se origina tanto por activación intrínseca, producto de la exacerbación de las vías de señalización intracelular dependientes de JAK2, como por efecto de la interacción con otras células, moléculas solubles y mediadores inflamatorios.

Plaquetas. Las evidencias de activación plaquetaria incluyen, entre otros, la expresión basal de P-selectina y CD40L. Ambas moléculas se localizan normalmente en la membrana de los gránulos alfa y se expresan en la superficie luego de la activación plaquetaria. Median la interacción de la plaqueta con leucocitos, tanto neutrófilos como monocitos, y con la célula endotelial⁽¹⁴⁾. La forma soluble de estas moléculas (sCD40L y sPsel) se encuentra aumentada en el plasma de los pacientes por clivaje a partir de la

membrana plaquetaria⁽¹⁵⁾. Además, las plaquetas activadas expresan fosfatidilserina en la membrana, lo que ofrece una superficie procoagulable, que favorece la activación de la coagulación y la generación de trombina. Por otra parte, hay un incremento en la fracción de plaquetas inmaduras, de mayor tamaño, que tendrían una mayor capacidad protrombótica.

Leucocitos. El rol de la activación leucocitaria ha sido enfatizado más recientemente en diversos estudios⁽¹⁶⁾. Tanto los neutrófilos como los monocitos cumplen un rol en la trombosis. La función protrombótica de los monocitos depende en parte de la expresión de factor tisular y la liberación de citoquinas, como la IL-1, la cual induce activación endotelial. En nuestro grupo, hemos demostrado que los monocitos de pacientes con TE presentan un perfil de activación selectiva y que la misma está asociada a la presencia de la mutación JAK2 V617F y a los antecedentes trombóticos⁽¹⁷⁾. Por otra parte, los neutrófilos favorecen la trombosis mediante la liberación de enzimas proteolíticas, como elastasa, que activa la coagulación, y catepsina G, que induce activación plaquetaria, la generación de especies reactivas del oxígeno que activan endotelio y plaquetas, y la expresión de moléculas de adhesión, como el CD11b/CD18 (Mac-1), que median la interacción con las plaquetas, favoreciendo la formación de agregados plaqueta-neutrófilo circulantes y con el endotelio, a través de ICAM-1. Las evidencias de activación de neutrófilos en pacientes con neoplasias mieloproliferativas están representadas por el aumento en la expresión de CD11b en la superficie, el aumento de elastasa y mieloperoxidasa circulantes⁽¹⁶⁾ y la presencia de agregados neutrófilo-plaqueta circulantes⁽¹⁴⁾. Además, un trabajo reciente demostró niveles aumentados de especies reactivas del oxígeno en neutrófilos de pacientes JAK2-positivos⁽¹⁸⁾, mientras que un trabajo llevado a cabo por nuestro grupo confirmó este hallazgo, extendiéndolo a los pacientes CALR-positivos⁽¹⁹⁾.

Trampas extracelulares de neutrófilos. Recientemente se describió un nuevo mecanismo por el cual los neutrófilos favorecen la trombosis, que consiste en la liberación de trampas extracelulares de ADN denominadas NETs (del inglés *neutrophil extracellular traps*). Éste es un mecanismo de defensa primordial en la inmunidad innata, mediante el cual

los neutrófilos atrapan, inmovilizan y combaten los microorganismos en el exterior celular. Además de este efecto beneficioso, las NETs constituyen una espada de doble filo, ya que ofrecen un sustrato propicio para la formación del trombo, participando en trombosis venosa y arterial y en una variedad de enfermedades protrombóticas, incluyendo sepsis, aterosclerosis, microangiopatías trombóticas, síndrome antifosfolípídico, etc. En nuestro laboratorio, exploramos el posible rol de las NETs en pacientes con neoplasias mieloproliferativas. Demostramos que, a pesar de que los neutrófilos se encuentran basalmente activados (aumento de CD11b en la membrana del neutrófilo y de mieloperoxidasa en plasma) y que hay mayor producción basal de especies reactivas del oxígeno, paso intermediario en la NETosis, la formación exacerbada de NETs *ex vivo* en ausencia de estímulos fue un fenómeno poco frecuente y se encontró restringido a un subgrupo limitado de pacientes. En respuesta a estímulos como IL-8, TNF α y PMA la formación de NETs se encontró normal o disminuida, esto último particularmente en la mielofibrosis. Hallamos aumento de nucleosomas (complejos ADN/histonas) circulantes, los cuales pueden originarse a partir de NETs o provenir de otras fuentes, como por ejemplo necrosis celular. La mayoría de los pacientes no presentaron complejos histona/mieloperoxidasa en plasma, propuestos como marcador más específico de NETs, evaluado mediante un ensayo de ELISA de desarrollo "casero," sugiriendo que en la mayoría de los pacientes en estado estable no hay evidencias de NETosis. Sin embargo, se requiere la disponibilidad de marcadores estandarizados sensibles y específicos para NETs, actualmente no disponibles, para concluir sobre este tema. Independientemente de su origen, el ADN y las histonas extracelulares tienen efectos protrombóticos y proinflamatorios, lo cual puede exacerbar el estado procoagulante en mieloproliferativos. Hallamos evidencias de activación endotelial (FVW), de coagulación (dímero D) y celular (agregados neutrófilo-plaqueta circulantes) en esta población de pacientes, con una correlación leve a moderada con los nucleosomas⁽¹⁹⁾. Estudios prospectivos contribuirán a definir el rol del aumento de nucleosomas en la clínica de los pacientes.

Endotelio. Existen además, en pacientes con mieloproliferativos, evidencias de daño y activación endotelial. Por un lado, la acción de proteasas leu-

cocitarias, citoquinas y especies reactivas del oxígeno contribuyen al mismo. Éste lleva a la expresión de moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de leucocitos y plaquetas, la liberación de factor von Willebrand. Existe además un defecto en la producción endógena de óxido nítrico, mecanismo antitrombótico fisiológico, que exacerba este escenario⁽²⁰⁾. Los marcadores de activación endotelial hallados aumentados en estos pacientes incluyen factor von Willebrand antigénico, E-selectina y trombosmodulina⁽¹⁵⁾.

Micropartículas. Además, hay generación de micropartículas que expresan factor tisular y favorecen la activación de la coagulación, producidas por plaquetas, leucocitos y endotelio, aunque la fuente principal son las plaquetas⁽²¹⁾.

Coagulación. El estado protrombótico puede manifestarse por aumento de marcadores de activación de coagulación, incluyendo el fragmento F1+2, complejos trombina-antitrombina y dímero D⁽²²⁾. Se ha descrito también la presencia de resistencia a la proteína C activada⁽¹³⁾.

Inflamación. El estrecho vínculo entre inflamación y trombosis en estos pacientes se evidencia por el valor de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y la pentraxina 3 como marcadores protrombóticos en estas entidades⁽²³⁾.

Relación de marcadores de activación con parámetros moleculares y clínicos

Como se describió, hay aumento de diversos marcadores de activación celular, endotelial y de coagulación en los pacientes con neoplasias mieloproliferativas. Éstos han sido medidos fundamentalmente en trombocitemia esencial y policitemia vera, mientras que hay menos estudios en mielofibrosis. En muchos casos, se ha demostrado que dichos marcadores se encuentran más aumentados en pacientes JAK2-positivos respecto a los JAK2-negativos e incluso se ha descrito una relación con la carga alélica de esta mutación. Por otra parte, en algunos casos existe una asociación entre estos parámetros y el antecedente de trombosis^(14-16,22). Asimismo, hay trabajos que han evaluado la evolución de los mismos y los distintos tratamientos, incluido anagrelide⁽²³⁾, hidroxiurea⁽¹³⁾ y ruxolitinib⁽²⁴⁾. Sin embargo, hasta el presente, nin-

guno de estos marcadores ha demostrado ser útil como marcador de riesgo trombótico. Esto puede deberse en parte a que son múltiples los mecanismos que participan en la predisposición trombótica y, si bien en algunos pacientes se demuestra la activación concomitante de todos los sistemas, en otros la contribución de los distintos compartimentos puede ser variable, involucrando preferencialmente uno u otro. Se requeriría de estudios prospectivos longitudinales para determinar la utilidad real de los mismos en el riesgo trombótico, lo cual es complicado desde el punto de vista metodológico, ya que hay múltiples factores involucrados, incluido el grupo de riesgo trombótico al cual pertenece el paciente y el tratamiento instituido.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013; 122:2176-2184.
2. Campbell PJ, Scott LM, Buck G y col. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005; 366:1945-1953.
3. Heller PG, Lev PR, Salim J y col. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol*. 2006;77:210-216.
4. Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res*. 2009;33:67-73.
5. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22:1299-1307.

6. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A y col. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120:5128-5133.
7. Rumi E, Pietra D, Ferretti V y col. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123:1544-1551.
8. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G y col. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013;368:22-33.
9. Walton BL, Lehmann M, Skorczewski T y col. Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood*. 2017 May 4;129:2537-2546.
10. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E y col. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112:3135-7.
11. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood*. 2009;114:759-63.
12. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013;122:2176-2184.
13. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012:571-581.
14. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*. 2006; 91:169-175.
15. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC y col. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*. 2009;84:102-108.
16. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V y col. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96:4261-4266.
17. Goette NP, Lev PR, Heller PG y col. Monocyte IL-2Ralpha expression is associated with thrombosis and the JAK2V617F mutation in myeloproliferative neoplasms. *Cytokine*. 2010;51:67-72.
18. Hurtado-Nedelec, M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T y col. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica*. 2013; 98: 1517-1524.
19. Marin Oyarzún CP, Carestia A, Lev PR y col. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Sci Rep*. 2016 13;6:38738.
20. Cella G, Marchetti M, Vianello F y col. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost*. 2010;104:151-156.
21. Trappenburg MC, van Schilfhaarde M, Marchetti M y col. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009;94:911-918.
22. Barbui T, Falanga A. Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2016;140 Suppl 1:S71-5.
23. Lussana F, Carobbio A, Salmoiraghi S y col. Driver mutations (JAK2V617F, MPLW515L/K or CALR), pentraxin-3 and C-reactive protein in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Hematol Oncol*. 2017;10:54.
23. Laguna MS, Kornbliht LI, Marta RF, Molinas FC. Thromboxane B2 and platelet derived growth factor in essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Medicina (B Aires)*. 2000;60:448-452.
24. Keohane C, McLornan DP, Sanchez K, Connor C, Radia D, Harrison CN. The effects of JAK inhibitor therapy upon novel markers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100: e348-50.