

**PAPEL DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y  
LEUCOCITARIA EN LA PATOGENIA DE LA  
TROMBOSIS EN LA TROMBOCITEMIA  
ESENCIAL**

*Tesis presentada por*

**EDUARDO ARELLANO RODRIGO**

*Para aspirar al*

**Grado de Doctor en Medicina**

*Director de la Tesis*

**FRANCISCO CERVANTES REQUENA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**Barcelona, 7 de Septiembre de 2009**



A mis padres, Ignacio y Angelines

A mi hermana, Miriam



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>17</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Etiopatogenia de la trombocitemia esencial</b>	<b>24</b>
1.1.1. Período previo al descubrimiento de la mutación V617F de <i>JAK2</i>	24
1.1.1.1. Clonalidad y crecimiento espontáneo de progenitores eritroides y megariocíticos	26
1.1.1.2. Alteraciones en la expresión del receptor de la trombopoyetina y de ciertos genes	28
1.1.2. Período posterior al descubrimiento de la mutación V617F de <i>JAK2</i>	29
1.1.2.1. Aspectos funcionales y estructurales de la mutación V617F de <i>JAK2</i>	31
1.1.2.2. Modelos murinos de enfermedad mieloproliferativa relacionados con la mutación V617F de <i>JAK2</i> y su presencia en la célula madre	37
1.1.3. Mutaciones del gen <i>MPL</i>	41
<b>1.2. Complicaciones trombóticas en la trombocitemia esencial</b>	<b>44</b>
1.2.1. Incidencia, fenotipo y localización	44
1.2.1.1. Alteraciones de la microcirculación	44
1.2.1.2. Trombosis mayores	45
<b>1.3. Patogenia de la trombosis y factores de riesgo trombótico en la trombocitemia esencial</b>	<b>53</b>
1.3.1. Factores independientes de la trombocitemia esencial	55
1.3.1.1. Edad	55
1.3.1.2. Historia de trombosis	57

1.3.1.3. Factores de riesgo cardiovascular	58
1.3.1.4. Alteraciones primarias de la coagulación	58
1.3.2. Factores dependientes de la trombocitemia esencial	61
1.3.2.1. Activación de la coagulación y del endotelio	61
1.3.2.2. Trombocitosis	63
1.3.2.3. Alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales de las plaquetas	66
1.3.2.3.1. Glucoproteínas y receptores de membrana	68
1.3.2.3.2. Metabolismo del ácido araquidónico	70
1.3.2.3.3. Agregación plaquetaria	72
1.3.2.3.4. Activación plaquetaria	74
1.3.2.3.5. Renovación plaquetaria	80
1.3.2.4. Leucocitosis	81
1.3.2.5. Activación leucocitaria	84
1.3.2.6. Interacción leucocito-plaqueta	91
1.3.2.7. Clonalidad y mutación V617F de <i>JAK2</i>	94
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>101</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>105</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>109</b>
<b>4.1. Trabajo 1. Aumento de la activación plaquetaria y leucocitaria como mecanismo contribuyente a la trombosis en la trombocitemia esencial y su correlación con el estado mutacional de <i>JAK2</i></b>	<b>111</b>
4.1.1. Resumen	113
4.1.2. Copia del Trabajo 1	115
<b>4.2. Trabajo 2. Renovación plaquetaria, factores de coagulación y marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial en la trombocitemia esencial: relación con la presencia de trombosis y la carga alélica V617F de <i>JAK2</i></b>	<b>123</b>

4.2.1. Resumen	125
4.2.2. Copia del Trabajo 2	127
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>135</b>
5.1. Aumento de la activación plaquetaria y leucocitaria como mecanismo contribuyente a la trombosis en la trombocitemia esencial y su correlación con el estado mutacional de <i>JAK2</i>	137
5.2. Renovación plaquetaria, factores de coagulación y marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial en la trombocitemia esencial: relación con la presencia de trombosis y la carga alélica V617F de <i>JAK2</i>	143
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>





## **AGRADECIMIENTOS**



A la Dra. Concepción Larrauri, mi primera Profesora de Hematología (10 de Octubre de 1987), por introducirme en este maravilloso campo del estudio de las enfermedades de la sangre.

Al Dr. Francisco Cervantes, mi mentor, por su generosidad y paciencia al brindarme la oportunidad de recurrir a su sentido común, tenacidad, experiencia y certero consejo durante mi formación médica e investigadora en un marco de amor al trabajo, confianza y perfeccionismo.

Al Dr. Joan Carles Reverter, por su permanente disposición, generosidad científica, confianza, carisma y crítica afectuosa, que sin duda me ha hecho ver en la coagulación sanguínea esa combinación de complejidad y sencillez que a la vez presenta.

Al Dr. Alberto Álvarez, por compartir inquietudes y esfuerzos durante la realización de estos trabajos, además de por su presencia incondicional, constante apoyo, desinteresada ayuda y amistad.

A la Dra. Neus Villamor, por su claridad de ideas, inestimable ayuda y apoyo en el estudio citométrico, de vital importancia en la presente tesis.

A la Dra. Dolors Colomer, por su destreza y habilidad en biología molecular, además de por su apoyo en el desarrollo de la PCR aleloespecífica para la mutación V617F de *JAK2*.

A la Dra. Beatriz Bellosillo, por su meticulosidad y eficiencia en la realización de la PCR cuantitativa a tiempo real para la mutación V617F de *JAK2*.

Al personal del Banco de Sangre y de los laboratorios de Hemostasia y Hematopatología del Hospital Clínic, por su colaboración y buena disposición en todo momento para poder llevar a cabo los estudios de investigación de la presente tesis.

Al Profesor Ricardo Castillo, pionero y maestro de la Hemoterapia y Hemostasia, quien fue un constante ejemplo de dedicación a la formación médica y científica para mi persona.

Al Profesor Ciril Rozman y a la Escuela de Hematología Farreras Valentí, por ser un gran modelo en el fluir de mi trayectoria personal desde mis primeros años de Facultad, hasta la culminación de mi sueño de formación en el Hospital Clínic, cuya influencia me llenó de satisfacción y orgullo.

Al Profesor Emili Montserrat, por transmitirme el buen hacer y el sentimiento de grupo, gracias a su rigor, disciplina y liderazgo de valor incuestionable durante mi formación.

Al Dr. Joan Bladé, mi tutor de dispensario, por su trato afectuoso y sus acertados consejos, críticas reflexiones y enseñanzas en el manejo clínico del paciente hematológico y en especial por regalarme el *Blood*.

Al Dr. Armando López, por todo lo que me ha enseñado sobre la hematología clínica de trinchera, además de por su paciencia y especial carisma.

Al Dr. Jordi Esteve, mi adjunto de la G024, quien me enseñó los innumerables secretos del manejo y tratamiento de las leucemias agudas, siempre con buen humor y bondad.

A los Dres. Francesc Bosch y Francesc Cobo, mis adjuntos responsables de la G1B7, por tantos buenos ratos, consejos y apoyo.

Al Dr. Benet Nomdedeu, por su amabilidad y ayuda prestada en tantas ocasiones, especialmente durante mi formación en el dispensario.

A los Dres. Enric Carreras, Montserrat Rovira, Alvaro Urbano, Carmen Martínez y Francesc Fernández, por su trato amable, incondicional ayuda y sus múltiples enseñanzas durante los apasionantes pases de visita a los pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Al Dr. Josep-Lluís Aguilar, mi profesor en Hematopatología, por su amabilidad, paciencia y delicadeza en enseñarme, guardarme preparaciones y por contarme la apasionante historia de la Escuela de Hematología Farreras Valentí y del Hospital Clínic.

A la Dra. María Rozman, mi maestra destacada en Hematopatología, le agradezco que me enseñara gran parte de lo que sé de esta disciplina, así como su dedicación y rigor.

A la Dra. Marta Aymerich, por su exquisita atención, cariño y sus numerosas enseñanzas acerca de la citometría de flujo.

Al Dr. Arturo Pereira, por su confianza, su incondicional ayuda, su enorme capacidad docente, su estímulo constante y eficaz transmisión de los conocimientos referentes a cualquier tema, especialmente en Inmunohematología.

Al Dr. Santiago Maragall, mi maestro en anticoagulación oral, por brindarme todos esos grandes secretos para un adecuado manejo de los enfermos que reciben este tratamiento, en un entorno incomparable de aprendizaje.

Al Dr. Joan Monteagudo, por contagiarme su pasión por la hemostasia en general y por la diátesis hemorrágica en particular, siempre con un particular y eficaz enfoque.

A los Dres. Dolors Tàssies, Miguel Lozano, Josep Maria Jou, Roberto Mazzara, Cristina Sanz y Anna Merino por su inestimable capacidad de formación, amabilidad y paciencia infinita.

Al Dr. Ginés Escolar, por su apoyo, entusiasmo y empeño constante en introducirme en el complejo mundo del estudio de la plaqueta y de su interacción con el endotelio.

A los enfermos, enfermeras y médicos del Hospital Clínic por haber tenido el honor y privilegio de cumplir un sueño y formarme como persona y hematólogo en esta gran institución gracias a sus enseñanzas que colmaron con creces mis ganas de aprender y que siempre estarán en mi corazón.





## **ABREVIATURAS**



<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AIT</b>	Accidente isquémico transitorio
<b>c-MPL</b>	Receptor de la trombopoyetina
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa 1
<b>Fg</b>	Fibrinógeno
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EMPC</b>	Enfermedad mieloproliferativa crónica
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>F1+2</b>	Fragmento 1 + 2 de la protrombina
<b>FERM</b>	Banda 4,1, ezarina, radixina, moesina
<b>F-MLP</b>	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
<b>FRCV</b>	Factores de riesgo cardiovascular
<b>FT</b>	Factor tisular
<b>TFm</b>	Factor tisular monocitario
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocíticas
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas
<b>ICAM-1</b>	Molécula 1 de adhesión intercelular
<b>JAK2</b>	Janus cinasa de tipo 2
<b>LMC</b>	Leucemia mieloide crónica
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MFP</b>	Mielofibrosis primaria
<b>MESF</b>	Moléculas equivalentes de fluorocromo soluble
<b>NMP</b>	Neoplasias mieloproliferativas
<b>MΦ</b>	Monocitos
<b>MPL</b>	Gen del receptor de la trombopoyetina
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del plasminógeno activado de tipo 1
<b>PCA</b>	Proteína C activada
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear neutrófilo
<b>PSGL-1</b>	Glucoproteína ligando de la P-selectina

<b>PIAS</b>	Inhibidores de las proteínas STAT activadas
<b>PR</b>	Plaquetas reticuladas
<b>PRV-1</b>	Policitemia rubra vera de tipo 1
<b>PS</b>	Proteína S
<b>PV</b>	Policitemia vera
<b>PVSG</b>	Polycythemia Vera Study Group
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<b>RAPCA</b>	Resistencia adquirida a la proteína C activada
<b>R-EPO</b>	Receptor de la eritropoyetina
<b>R-GCSF</b>	Receptor de factor estimulador de colonias granulocíticas
<b>RR</b>	Riesgo relativo
<b>SBC</b>	Síndrome de Budd-Chiari
<b>sCD40L</b>	CD40 ligando soluble
<b>SOCS</b>	Supresores de la señalización de citocinas
<b>sP-selectina</b>	P-selectina soluble
<b>sTM</b>	Trombomodulina soluble
<b>STAT</b>	Proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción
<b>TAFI</b>	Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina
<b>TE</b>	Trombocitemia esencial
<b>TEEP</b>	Trombosis del eje espleno-portal
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>tPA</b>	Activador tisular del plasminógeno
<b>TPO</b>	Trombopoyetina
<b>TRAP</b>	Péptido activador del receptor de la trombina
<b>VCAM-1</b>	Molécula soluble de adhesión vascular de tipo 1
<b>VWF:Ag</b>	Antígeno del factor de von Willebrand

# **I. INTRODUCCIÓN**



**L**a trombocitemia esencial (TE) es una de las enfermedades mieloproliferativas crónicas (EMPC) cromosoma Filadelfia-negativas “clásicas”, junto a la policitemia vera (PV) y la mielofibrosis primaria (MFP) (Campbell y Green, 2006). En la clasificación del 2008 de la OMS (Tefferi y Vardiman, 2008) estas entidades, que comparten ciertas características clínicas y biológicas (Campbell y Green, 2006), reciben el nombre de neoplasias mieloproliferativas (NMP). Se trata de proliferaciones clonales cuyo origen reside en una célula madre pluripotencial de la hemopoyesis que causa una producción excesiva de células mieloides maduras (Campbell y Green, 2006; Levine y Gilliland, 2008). Concretamente, la TE se caracteriza por una trombocitosis persistente asociada a una hiperplasia megacariocítica en la médula ósea (Tefferi y Vardiman, 2008) y un aumento de la incidencia de complicaciones trombóticas y hemorrágicas (Besses *et al*, 1999; Finazzi y Barbui, 2008). La TE es probablemente la NMP más frecuente en nuestro medio (Besses, 1999), con una incidencia que oscila entre 0,59 y 2,53 casos por 100.000 habitantes y año (Mesa *et al*, 1999; Ridell *et al*, 2000; Jensen *et al*, 2000; Girodon *et al*, 2005; Johansson, 2006; Ma *et al*, 2008). A largo plazo, en la TE existe un riesgo aumentado de evolución a mielofibrosis (Cervantes *et al*, 2002), PV (Jantunen *et al*, 1999) o leucemia aguda (Cervantes *et al*, 1991 y 2008; Gangat *et al*, 2006).

Aunque la trombosis constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con TE (Besses *et al*, 1999; Finazzi y Barbui, 2008), no se conocen bien los mecanismos íntimos implicados en su aparición (Schafer, 1984; Elliott y Tefferi, 2005; Landolfi *et al*, 2006). A pesar de los avances en los mecanismos de trombogénesis en otras enfermedades

vasculares (Furie y Furie, 2008), no ha ocurrido lo mismo en esta enfermedad. Tradicionalmente se ha considerado que la propia trombocitosis y las alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales de las plaquetas de los enfermos con TE eran los factores determinantes de la trombosis. Sin embargo, no existe una correlación clara entre estos hallazgos y la frecuencia de trombosis (Schafer, 1984; Wehmeier *et al*, 1997; Elliott y Tefferi, 2005). Cabe destacar que Falanga *et al* (2000) observaron un incremento de la activación de los neutrófilos y su relación con marcadores de activación de la coagulación en la TE, lo cual podría contribuir a la trombogénesis.

El descubrimiento en 2005 de la mutación V617F del gen Janus cinasa de tipo 2 (*JAK2*) en el 95% de los pacientes con PV y en la mitad de los casos de TE y MFP (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005) ha supuesto un importante avance en el conocimiento de la patogenia molecular y ha facilitado el diagnóstico de estas neoplasias (Schafer, 2006 Levine y Gilliland, 2008). La implicación de las plaquetas y los leucocitos y su interacción en la patogenia de la trombosis de los pacientes con TE y su relación con la mutación V617F de *JAK2* constituyen la base de la presente tesis doctoral.

## **1.1. Etiopatogenia de la trombocitemia esencial**

### **1.1.1. Período previo al descubrimiento de la mutación V617F de *JAK2***

En la tabla 1 se describe la secuencia histórica de las principales aportaciones científicas en la TE, que iremos desgranando progresivamente.



**Tabla 1. Secuencia histórica de las principales aportaciones científicas en la TE**

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Hallazgo</b>
Epstein y Goedel	1934	Primer paciente catalogado de TE
Dameshek	1951	Concepto de EMPC
Prchal y Axelrad	1974	Crecimiento endógeno de colonias eritroides
Fialkow <i>et al</i>	1981	Hemopoyesis clonal
Gerwitz <i>et al</i>	1983	Crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas
Baxter <i>et al</i> , James <i>et al</i> , Kralovics <i>et al</i> , Levine <i>et al</i> , Zhao <i>et al</i>	2005	Mutación V617F del gen <i>JAK2</i>
Pikman <i>et al</i> Pardanani <i>et al</i>	2006	Mutaciones del gen <i>MPL</i>
Kilpivaara <i>et al</i> , Jones <i>et al</i> , Olcaydu <i>et al</i>	2009	Relación de la mutación V617F con el haplotipo 46/1 del gen <i>JAK2</i>

La TE fue descrita por primera vez en el año 1934 por dos patólogos austríacos, Emil Epstein y Alfred Goedel, quienes denominaron a dicha entidad “trombocitemia hemorrágica”. El paciente de 56 años de edad descrito por estos autores presentaba trombocitosis ( $> 1.000 \times 10^9/L$ ), ligera eritrocitosis, hiperplasia megacariocítica, esplenomegalia y sangrado mucocutáneo recurrente y falleció tras la amputación del tercer dedo del pie derecho por gangrena (Epstein y Goedel, 1934). Posteriormente se describieron en la literatura casos similares de trombocitemia con trombosis o hemorragia bajo diferentes nombres, tales como trombocitemia hemorrágica, trombocitemia idiopática, trombocitemia, TE, leucemia megacariocítica, tromboblastemia y

piastrinemia (Tefferi, 2008). En 1951 William Dameshek introdujo por primera vez el concepto de enfermedad mieloproliferativa para agrupar a la leucemia mieloide crónica (LMC), la PV, la TE y la MFP como entidades próximas entre sí, por presentar un aumento en la proliferación de células mieloides, debido a una alteración desconocida que estimulaba dicha proliferación, junto con una tendencia a la trombosis y la hemorragia y la frecuente presencia de esplenomegalia y fibrosis de la médula ósea. El descubrimiento por Nowell y Hungerford del cromosoma Filadelfia en 1960 confirió una personalidad especial a la LMC dentro de este grupo, pasándose a denominar a partir de entonces al resto de entidades síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Filadelfia-negativos. Ciñéndonos a la TE, Fanger *et al* (1954) en una revisión de la literatura diferenciaron entre la trombocitemia idiopática por enfermedad de la médula ósea y la trombocitemia secundaria a otros procesos. En 1960 se definió a la TE como una enfermedad mieloproliferativa caracterizada por diátesis hemorrágica o trombótica, trombocitosis, hiperplasia megacariocítica y ausencia de infiltración leucémica (Gunz, 1960; Ozer *et al*, 1960).

#### **1.1.1.1. Clonalidad y crecimiento espontáneo de progenitores eritroides y megariocíticos**

Inicialmente se especulaba con la posibilidad de que un esteroide u otra hormona pudiera actuar como factor estimulador de la mielopoyesis (Dameshek, 1951). Veinte años después, Jaroslav Prchal y Arthur Axelrad (1974) demostraron que los progenitores eritroides de la médula ósea de pacientes con PV o TE podían cultivarse *in vitro* en ausencia de eritropoyetina

(crecimiento espontáneo o endógeno de colonias), a diferencia de lo que ocurre en sujetos sanos, en los cuales es necesaria la presencia de la misma. El citado hallazgo sugería un comportamiento neoplásico de la proliferación, cuyo origen clonal se demostró en 1981 a partir del estudio de los patrones de inactivación del cromosoma X en mujeres con TE. Así, se observó un patrón clonal al estudiar una variante polimórfica del gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) ligado al cromosoma X (esto es, todas las células presentaban el mismo tipo de isoenzima), lo cual indicaba que la TE se originaba a partir de un progenitor hemopoyético clonal (Fialkow *et al*, 1981). Investigaciones posteriores con el análisis de otros genes (HUMARA, IDS, MPP1/p55, G6PD) o del ARN mensajero para valorar los patrones de inactivación (metilación) del cromosoma X confirmaron la clonalidad en mujeres con TE, si bien en una proporción variable según los estudios (Janssen *et al*, 1990; El-Kassar *et al*, 1995, 1997 y 1988; Champion *et al*, 1997; Harrison *et al*, 1999; Mitterbauer *et al*, 1999; Chiusolo *et al*, 2001; Shih *et al*, 2001 y 2002; Zamora *et al*, 2005; Chen y Prchal, 2007).

El crecimiento espontáneo de progenitores megacariocíticos en la mayoría de los pacientes con TE se describió posteriormente (Gerwitz *et al*, 1983; Komatsu *et al*, 1986; Florensa *et al*, 1995), observándose crecimiento espontáneo de colonias eritroides en el 70 % de los pacientes o megacariocíticas en el 63,3 % de ellos (Florensa *et al*, 1995). Además, en analogía a la hipersensibilidad de los progenitores eritroides a ciertas citocinas en la PV (eritropoyetina, interleucina 3, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor de crecimiento similar a la insulina 1), se observó que en la TE los progenitores megacariocíticos presentan una

hipersensibilidad marcada a la trombopoyetina (Taksin *et al*, 1999; Axelrad *et al*, 2000). En este sentido, la ausencia de mutaciones en los dominios extracelulares de los receptores de citocinas y el aumento de la afinidad de los mismos (Harrison *et al*, 1988; Kiladjian *et al*, 1997; Taksin *et al*, 1999; Allen *et al*, 2001) permitió hipotetizar con la posible existencia de una alteración común en la vía de señalización de estos receptores (Parganas *et al*, 1988; James *et al*, 2005a).

#### **1.1.1.2. Alteraciones en la expresión del receptor de la trombopoyetina y de ciertos genes**

La expresión del receptor de la trombopoyetina (c-MPL) en los megacariocitos y las plaquetas de los pacientes con TE y otras NMP está disminuida (Horikawa *et al*, 1997; Moliterno *et al*, 1998; Harrison *et al*, 1999a). Además, se ha observado una expresión anormal del oncogén Bcl-xL (inhibidor de la apoptosis) en los progenitores eritroides de la PV (Silva *et al*, 1988) y en los megacariocitos de la TE (Zhang *et al*, 2004). Otro hallazgo común a las NMP, aunque poco específico, es la sobreexpresión del ARN mensajero del gen PRV-1 (de policitemia rubra vera). Estos datos sugerían el concurso de las vías de señalización post-receptor y, más específicamente, de la vía de *JAK2* en la patogenia de estas neoplasias (James *et al*, 2005a). La expresión de Bcl-xL está regulada por la vía *JAK2-STAT* (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción) (Silva *et al*, 1988), que es crucial en la maduración y estabilidad de los receptores de la eritropoyetina (R-Epo) y la trombopoyetina (c-MPL) (Huang *et al*, 2001; Royer *et al*, 2005).

Otras evidencias que implicaban a *JAK2* como posible gen candidato en los pacientes con PV fueron las siguientes: i) la disminución de la frecuencia de flebotomías en pacientes tratados con imatinib (Silver, 2003); ii) la inhibición del crecimiento endógeno de colonias eritroides mediante la adición de imatinib (Oehler *et al*, 2003) u otros inhibidores específicos (AG490) (Ugo *et al*, 2004); y iii) el descubrimiento de la pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 9 en el 33% de los pacientes, debido a un mecanismo de recombinación mitótica (Kralovics *et al*, 2003).

### **1.1.2. Período posterior al descubrimiento de la mutación V617F de *JAK2***

En Marzo de 2005 cinco grupos independientes (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005) demostraron de forma simultánea la presencia de una mutación puntual localizada en el gen de la cinasa *JAK2* en la mayoría de pacientes con PV y en aproximadamente la mitad de aquellos con TE y MFP. Se emplearon tres estrategias para la secuenciación del gen *JAK2*. En la primera se consiguió la inhibición del crecimiento endógeno de colonias eritroides mediante inhibidores químicos o ARN interferente de *JAK2* (James *et al*, 2005). En la segunda se estudió un fragmento de 6,2 Mbp común a todos los pacientes con pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 9 y que contenía el gen de *JAK2* (Kralovics *et al*, 2005). La tercera estrategia consistió en un cribado de las posibles mutaciones de varias tirosinocinasas mediante secuenciación del ADN (Baxter *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005), demostrando la ausencia de la mutación en las células epiteliales que ésta era un hecho adquirido.

La mutación V617F puede detectarse en sangre total, granulocitos, plaquetas, preparaciones de médula ósea y en progenitores hemopoyéticos obtenidos en cultivos celulares *in vitro*. Pueden aplicarse diferentes técnicas para detectar su presencia. Utilizando los criterios diagnósticos del *Polycythemia Vera Study Group* (PVGS) o de la OMS y diferentes métodos de detección de la mutación de *JAK2*, la frecuencia de la mutación en la TE oscila entre el 23 % y el 75 %, según los estudios (Antonioli *et al*, 2005 y 2008; Baxter *et al*, 2005; Campbell *et al*, 2005; Goerttler *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Jelinek *et al*, 2005; Jones *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Tefferi *et al*, 2005a; Wolanskyj *et al*, 2005; Carobbio *et al*, 2006, 2008 y 2008a; Cheung *et al*, 2006; Bellosillo *et al*, 2006; Heller *et al*, 2006; Horn *et al*, 2006; Levine *et al*, 2006; Lippert *et al*, 2006; Moliterno *et al*, 2006; Murugesan *et al*, 2006; Passamonti *et al*, 2006; Remacha *et al*, 2006; Stevenson *et al*, 2006; Vannucchi *et al*, 2006; Vizmanos *et al*, 2006; Ahn *et al*, 2007; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Andrikovics *et al*, 2007; Finazzi *et al*, 2007; Gale *et al*, 2007; Hsiao *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Ohyashiki *et al*, 2007 y 2008; Pemmaraju *et al*, 2007; Rudzki *et al*, 2007; Speletas *et al*, 2007; Toyama *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Moreno *et al*, 2008; Wong *et al*, 2008; Cho *et al*, 2009; Mustjoki *et al*, 2009). Entre las técnicas disponibles, una de las que tienen mayor sensibilidad es la PCR aleloespecífica cuantitativa. En pacientes de reciente diagnóstico y con el uso de esta técnica se obtiene una prevalencia de la mutación del 97% en la PV, mientras que en la TE es del 75% (Lippert *et al*, 2006). El descubrimiento de la mutación V617F del gen *JAK2* ha tenido un gran impacto en la práctica clínica, al facilitar el diagnóstico de la TE y de las otras NMP (Tefferi *et al*, 2007). Sin embargo, dada la existencia de casos de

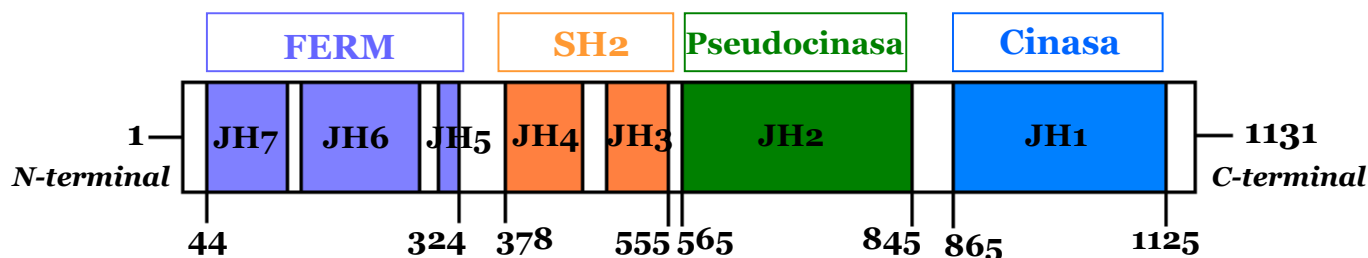
TE sin la mutación, según los criterios diagnósticos de la OMS es necesario excluir otras neoplasias mieloides o trombocitosis secundarias y tener en cuenta asimismo los hallazgos de la biopsia de médula ósea (Tefferi *et al*, 2007; Tefferi y Vardiman, 2008).

#### **1.1.2.1. Aspectos funcionales y estructurales de la mutación V617F de *JAK2***

JAK2 pertenece a una familia de proteínas citoplasmáticas con actividad tirosinocinasa que incluye también JAK1, JAK3 y TYK2 (Harpur *et al*, 1992). JAK2 desempeña un papel crucial en la transmisión al interior de la célula de señales desde los receptores de citocinas tipo I, entre los que se encuentran los receptores de la eritropoyetina, el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), el factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF) o la c-MPL (Rane y Reddy, 2000; Sandberg *et al*, 2004; Khwaja, 2006). La importancia de JAK2 en la hemopoyesis se ha demostrado mediante el uso de ratones *knock-out* (*JAK2*  $-/-$ ) para este gen (Neubauer *et al*, 1988; Parganas *et al*, 1988) o modificando su expresión génica (*knock-down*) en el pez cebra (Ma *et al*, 2007). Estos modelos presentaron una ausencia total de progenitores eritropoyéticos y todos los animales murieron en una fase precoz de su desarrollo embrionario.

Desde el punto de vista estructural, JAK2 presenta 7 dominios homólogos (JH), denominados como JH1 a JH7 (Wilks *et al*, 1991; Rane y Reddy, 2000; Khwaja, 2006) (ver figura 1). En la región carboxi-terminal se encuentran el dominio JH1, con actividad cinasa, y el JH2, sin actividad cinasa

(pseudocinasa). El dominio JH2 tiene propiedades autoinhibitorias sobre la actividad cinasa de JH1 (Saharinen *et al*, 2000; Lindauer *et al*, 2001).



**Figura 1. Estructura de la tirosinocinasa *JAK2*.** De la región carboxi-terminal a la amino-terminal (aminoácidos 1131 a 1), la proteína *JAK2* tiene siete dominios bien caracterizados, llamados dominios homólogos (JH, de JH1 a JH7). Sin embargo, desde el punto de vista funcional, *JAK2* presenta cuatro dominios con propiedades específicas (esto es, cinasa, pseudocinasa, SH2 y FERM). Así, el dominio JH1 tiene la actividad tirosinocinasa (que añade grupos fosfato a los residuos tirosina) propia de la proteína. Aunque el dominio JH2 tiene una estructura similar a JH1, carece de actividad cinasa, debido a la ausencia de ciertos aminoácidos que se requieren para esta determinada función. No obstante, el dominio JH2 tiene una importante acción autoinhibitoria sobre el dominio JH1, es decir, regula de forma negativa su actividad cinasa. El dominio homólogo a SH2 (del oncogén src; incluye a JH3 y JH4) está implicado en la interacción con intermediarios en la señalización celular como las proteínas STAT (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción), moléculas adaptadoras (Shc, Gab/IRS) y subunidades cinasa de regulación (p85 fosfoinositol-3-cinasa). Finalmente, el dominio llamado FERM (JH5, JH6 y JH7) está constituido por una secuencia particular (que incluye a la banda 4,1, ezarina, radixina, moesina), la cual, se une de forma covalente a los receptores de las citocinas tipo I.

Precisamente por la presencia de estos dos dominios cinasa adyacentes, uno activo (JH1) y otro inactivo (JH2), la proteína recibió el nombre



de “JAnus Kinase” en honor al dios romano Janus (Jano), el protector de las puertas del cielo, que se representa con dos caras mirando en sentidos opuestos. Otra acepción menos conocida del nombre *JAK2* sería “Just Another Kinase”, ya que, cuando fue descubierta, la importancia de esta molécula no fue apreciada (Tefferi y Gilliland, 2005; Khwaja, 2006). JH3 y JH4 contienen un dominio similar a SH2 (del oncogén *src*), lugar donde se produce la fosforilación de STAT. Finalmente JH5-7 está constituida por un dominio llamado FERM (banda 4,1, ezarina, radixina, moesina), el cual se une de forma covalente a los receptores de las citocinas (Wilks *et al*, 1991; Rane y Reddy, 2000; Khwaja, 2006).

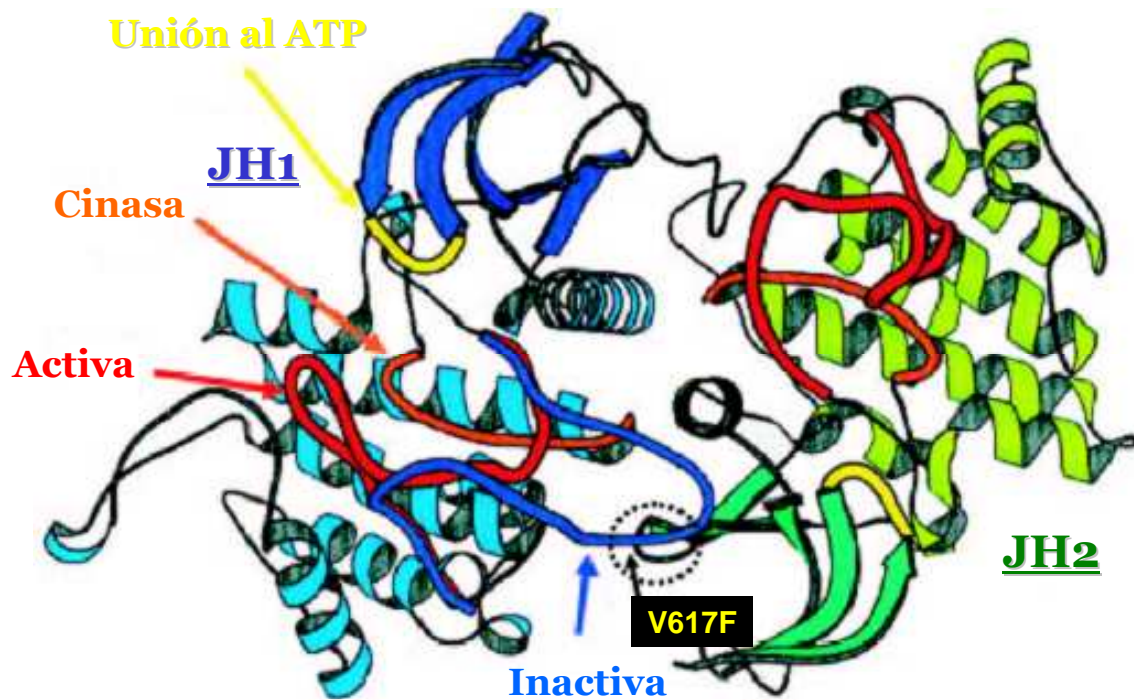
En condiciones normales la unión de la eritropoyetina o trombopoyetina a su receptor causa cambios en la conformación de éste y en la *JAK2* unida, determinando la expresión de su actividad cinasa por una separación entre el dominio JH1 y JH2 (Saharinen *et al*, 2000; Lindauer *et al*, 2001). A su vez, el receptor se dimeriza, de forma que las dos moléculas de *JAK2* unidas al dominio yuxtamembrana citoplasmático del receptor se aproximan y se activan mutuamente por fosforilación (transfosforilación) (Witthuhn *et al*, 1993; Remy *et al*, 1999; Seubert *et al*, 2003; Tefferi y Gilliland, 2005; Kaushansky, 2005 y 2006; Lu *et al*, 2006). Una vez activada *JAK2*, ésta recluta a las proteínas STAT, que se fosforilan y dimerizan, entrando en el núcleo, donde activan la transcripción de genes implicados en la proliferación, apoptosis y supervivencia (Rane y Reddy, 2000; Sandberg *et al*, 2004; Tefferi y Gilliland, 2005; Kaushansky, 2005 y 2006; Khwaja, 2006). Entre los mecanismos de control de esta vía se incluyen las fosfatasa con homología *Scr* (SHP-1), los supresores de la señalización de citocinas (SOCS) y los inhibidores de las proteínas STAT

activadas (PIAS) (Rane y Reddy, 2000; Sandberg et al, 2004; Tefferi y Gilliland, 2005).

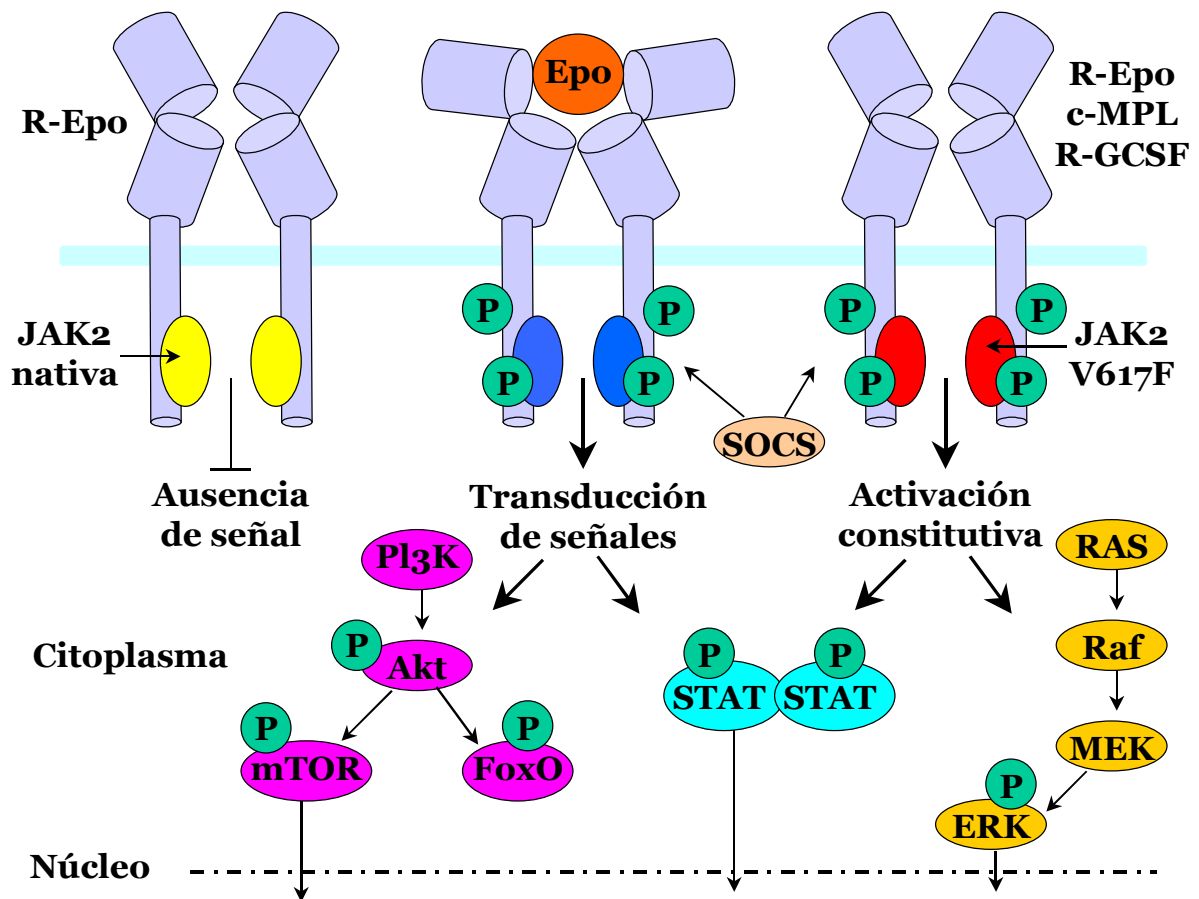
La mutación V617F de *JAK2* es una mutación puntual, que afecta al nucleótido 1849 y provoca un cambio de una guanina por una timidina (G>T). Por este motivo, se produce un cambio en la proteína final, en la que el aminoácido 617 (situado en el dominio pseudocinasa JH2), en lugar de ser una valina, es una fenilalanina (V617F) (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005). Como consecuencia de la mutación V617F no se produce la inhibición del dominio cinasa JH1 (por parte del dominio pseudocinasa JH2), lo que resulta en una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando al receptor hemopoyético. Es, por tanto, una mutación que provoca una *ganancia de función*, es decir, una activación permanente de las diferentes vías de transducción de señales dependientes de los receptores de citocinas tipo I (Baxter *et al*, 2005; Cazzola y Skoda, 2005; Goldman, 2005; James *et al*, 2005 y 2005a; Kaushansky, 2005a; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Lu *et al*, 2005; Shannon y Van Etten, 2005; Tefferi y Gilliland, 2005; Dusa *et al*, 2008).

**Tabla 2. Secuencia de ADN y de la proteína JAK2 en su forma nativa y mutada**

	JAK2 nativa (wild-type)								JAK2 mutada							
ADN	tat	gga	gta	tgt	gtc	tgt	gga	gac	tat	gga	gta	tgt	ttc	tgt	gga	gac
Proteína	Y	G	V	C	V	C	G	D	Y	G	V	C	F	C	G	D
					↑ 617								↑ 617			



**Figura 2. Estructura de JAK2 basada en un modelo del receptor de crecimiento fibroblástico.** Se muestran los diagramas de cinta para los dominios JH1 (de color azul predominante) y JH2 (de color verde) de JAK2. El bucle de activación de JH2 está representado en dos configuraciones, una activa (rojo) y otra inactiva (azul). La región con actividad cinasa aparece en color naranja y el sitio de unión al ATP en color amarillo. Se muestra también el sitio de interacción de JH2 (círculo de puntos, donde figura V617) con el bucle de activación de JH1 para inhibir su función. Tomada y modificada de Lindauer *et al*, 2001 y Kaushansky, 2005a.



**Figura 3. Mecanismo de activación de la actividad cinasa en la mutación V617F de JAK2.** En condiciones normales cuando el receptor de la eritropoyetina (R-Epo) no está unido a su ligando (eritropoyetina, Epo), la proteína JAK2 nativa (wild-type) permanece inactiva (esto es, desfosforilada), sin que se transmita ninguna señal al interior celular. Tras la unión con la eritropoyetina, el R-Epo se activa y se produce la fosforilación de JAK2 (grupos P), la cual, a su vez, fosforila y activa a diferentes moléculas que intervienen en la transmisión de señales al interior celular, tales como las proteínas STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción), RAS, la cinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía de la fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3K)-Akt. Los supresores de la señalización de citocinas (SOCS) están implicados en la inhibición de esta vía. Determinados mediadores de estas vías de señalización, alcanzan el núcleo causando efectos sobre la transcripción de genes y por ende sobre la apoptosis, ciclo celular y diferenciación de las células hematopoyéticas. Cuando JAK2 presenta la mutación V617F,

permanece fosforilada en ausencia de ligando (ganancia de función), dando como resultado una activación continua de las vías de transmisión de señales. Como la mutación se produce en un progenitor hemopoyético, da lugar a un estímulo de las tres series, ya que *JAK2* está implicada en la transmisión de señales de los receptores de la Epo (R-Epo), el G-CSF (RGCSF) y la trombopoyetina (c-MPL). Modificado de James *et al*, 2005a; Campbell y Green, 2006; Levine *et al*, 2007; Morgan y Gilliland, 2008; Kota *et al*, 2008.

Existen dudas de si esta ganancia de función es debida a una activación constitutiva propiamente dicha o a una hiperactivación de la cinasa mutada (Kota *et al*, 2008; Kundrapu *et al*, 2008). Es bien conocido que la proteína SOCS3 es un modulador negativo de la transducción del receptor de la EPO (Hortner *et al*, 2002; Khwaja, 2006; Kota *et al*, 2008). De este modo, es posible que la mutación de *JAK2* pueda escapar a la inhibición fisiológica de SOCS3 por hiperfosforilación de esta última (Hookham *et al*, 2007; Kota *et al*, 2008). Por tanto, la ausencia de la inhibición del dominio cinasa JH1 de *JAK2* y la resistencia a la acción inhibitoria de SOCS3 son dos de los mecanismos para explicar las propiedades únicas de la mutación V617F en las NMP.

#### **1.1.2.2. Modelos murinos de enfermedad mieloproliferativa relacionados con la mutación V617F de *JAK2* y su presencia en la célula madre**

En un modelo murino en el que se trasplantaron ratones con progenitores hemopoyéticos portadores de la mutación V617F de *JAK2*, los animales desarrollaron un cuadro clínico similar al de la PV, consistente en esplenomegalia, eritrocitosis y leucocitosis (James *et al*, 2005; Wernig *et al*, 2006; Lacout *et al*, 2006; Bumm *et al*, 2006; Zaleskas *et al*, 2006). No se

observó trombocitosis, ya que la expresión elevada del *JAK2* mutado causaba una inhibición en la diferenciación de los megacariocitos (Lacout *et al*, 2006). Los estudios de laboratorio realizados en estos ratones confirmaron la existencia de un crecimiento endógeno de colonias eritroides y una activación constitutiva de la STAT5, al igual que ocurre en la TE y PV. Además, meses después del trasplante los ratones desarrollaron un cuadro clínico similar al de la mielofibrosis post-policitémica. Estos resultados proporcionan una evidencia directa de que la mutación V617F de *JAK2* interviene en la génesis de las NMP (James *et al*, 2005; Bumm *et al*, 2006; Lacout *et al*, 2006; Wernig *et al*, 2006).

La mutación V617F de *JAK2* se ha detectado en los progenitores hemopoyéticos obtenidos de cultivos de colonias eritroides, granulomonocíticas y megacariocíticas (Baxter *et al*, 2005; Scott *et al*, 2006; Florensa *et al*, 2006), así como en las células CD34 positivas (Jamieson *et al*, 2006; Ishii *et al*, 2006; Delhommeau *et al*, 2007), lo cual indica, que tanto la PV como la TE, tienen su origen en una célula madre hemopoyética multipotente.

En la actualidad, existen varias líneas de evidencia que indican diferencias cuantitativas y/o cualitativas en la señalización mediada por la mutación V617F en las diferentes NMP. En primer lugar, la carga alélica de V617F es más elevada en las plaquetas que en los granulocitos de los pacientes con TE, hecho que no se ha observado en la PV y que apoyaría la afectación predominante del megacariocito en esta enfermedad (Moliterno *et al*, 2006; Bellosillo *et al*, 2007; Toyama *et al*, 2007). Además, la distribución de la carga mutacional V617F en los granulocitos entre los pacientes con NMP es diferente, siendo inferior en la TE con respecto a la PV y MFP ( $26 \pm 15\%$ ,  $48 \pm 26\%$  y  $74 \pm 24\%$ , respectivamente) (Vannucchi *et al*, 2008a). Del mismo modo,

el fenómeno de dominancia clonal (carga alélica de JAK2 en neutrófilos menos la de las células CD34+ igual o inferior al 10%) se observó en el 22% de los pacientes con TE, el 53% de los pacientes con PV y el 90% de los pacientes con MFP (Moliterno *et al*, 2008). En segundo lugar, la recombinación mitótica del brazo corto del cromosoma 9 que causa homocigosidad para la mutación V617F (esto es, una carga alélica superior al 50%), se detecta en el 30% de los granulocitos de los pacientes con PV y únicamente en el 2-4% de los pacientes con TE (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005). Sin embargo, cuando se estudian progenitores obtenidos a partir de cultivos eritroides de los mismos pacientes, en torno al 90% de los pacientes con PV son homocigotos, hallazgo que no se ha observado en la TE (Scott *et al*, 2006). Esta diferencia sugiere que la homocigosidad de la mutación promovería el desarrollo de la PV. Así, la homocigosidad de la mutación V617F se asocia a una activación de las vías de transducción de señales asociadas a JAK2 mayor que la observada en heterocigosidad (Kralovics *et al*, 2005a). Además se ha observado que la mutación V617F confiere un aumento de la recombinación homóloga e inestabilidad genética (Plo *et al*, 2008). En tercer lugar, un nivel bajo de expresión de la mutación V617F en ratones transgénicos causa un fenotipo similar al de la TE, con trombocitosis y ausencia de policitemia (Shide *et al*, 2008; Tiedt *et al*, 2008; Xing *et al*, 2008).

No se conoce bien si hay factores genéticos o ambientales que podrían promover el desarrollo de una NMP tipo TE, pero dichos factores podrían explicar por qué la misma mutación en unos pacientes da lugar a una PV y en otros a la TE (James, 2008). Algunos trabajos recientemente publicados han sugerido que, además de JAK2, existirían otras mutaciones que intervendrían

en la génesis de la TE y que incluso la precederían. En este sentido, cabe destacar que en torno al 5% de pacientes con TE tienen deleciones de 20q u otras alteraciones citogenéticas (Bench *et al*, 1988; Reilly, 2008). Se ha descrito que la deleción de 20q ocurría antes o después de la adquisición la mutación V617F en la TE, por lo que la citada deleción no parece ser un factor predisponente para esta mutación (Kralovics *et al*, 2006 y 2008; Schaub *et al*, 2009). A este respecto, se ha descrito recientemente la presencia de diversas mutaciones en el oncogén supresor TET2 (*Ten-Eleven Translocation 2*) en aproximadamente el 5% de los pacientes con TE (Abdel-Wahab *et al*, 2009; Tefferi *et al*, 2009), las cuales se asociaban con frecuencia a la mutación de *JAK2* y a una mayor edad (Tefferi *et al*, 2009). A favor de una proliferación clonal previa a la adquisición de la mutación V617F iría el hallazgo, en los estudios de patrones de inactivación del cromosoma X, de un mayor porcentaje de granulocitos mutados detectados por esta técnica que los cuantificados para *JAK2* (Campbell *et al*, 2006a; Kiladjian *et al*, 2006; Levine *et al*, 2006; Gale *et al*, 2007; Kralovics, 2008). En la misma línea, se han descrito pacientes con TE V617F positiva en los que, cuando la enfermedad evolucionó a leucemia aguda, las células leucémicas eran V617F negativas (Campbell *et al*, 2006a; Theocharides *et al*, 2007; Tam *et al*, 2008), lo cual indicaría un origen leucémico a partir de un clon previo a la adquisición de la mutación de *JAK2*. Por último, en casos familiares de TE, se ha demostrado que la mutación de *JAK2* es adquirida (Bellanne-Chantelot *et al*, 2006; Rumi *et al*, 2006 y 2007; Higgs *et al*, 2008; Percy y Rumi, 2008), existiendo, por tanto, una predisposición heredada y anticipación genética para esta mutación. El análisis de los polimorfismos de nucleótido único de los genes en *JAK2*, c-MPL, R-Epo



y RGCSF (receptor de G-CSF) ha permitido describir la asociación de determinados polimorfismos con la TE o PV (Pardanani *et al*, 2008). Además, un estudio reciente ha encontrado un aumento del riesgo de NMP en los familiares de primer grado afectados de TE o PV, lo que sugiere la existencia de alelos comunes de susceptibilidad para las formas esporádicas (Landgren *et al*, 2008). Recientemente se ha descrito que más del 80% de las NMP V617F positivas se asocian con la presencia del haplotipo 46/1 de *JAK2* (con polimorfismos de nucleótido único tales como rs10974944 y otros) (Jones *et al*, 2009; Kilpivaara *et al*, 2009; Olcaydu *et al*, 2009).

### **1.1.3. Mutaciones del gen *MPL***

En contraste con la PV, en la cual la mutación V617F y las mutaciones del exón 12 de *JAK2* están presentes en prácticamente todos los pacientes (Martínez-Avilés *et al*, 2007; Scott *et al*, 2007; Alvarez-Larrán, 2008), la mitad de los enfermos con TE o MFP son V617F negativos. Dado el posible papel de la vía de *JAK2* en la patogenia de estos últimos pacientes, se realizó una secuenciación de los dominios transmembrana e yuxtamembrana de ciertos receptores de citocinas tipo I que condujo al descubrimiento de varias mutaciones en el codón 515 del gen c-Mpl (*MPL*) (Pardanani *et al*, 2006; Pikman *et al*, 2006). A diferencia de la V617F, se han descrito dos mutaciones en el aminoácido 515 que provocan un cambio de triptófano por leucina (W515L) o lisina (W515K) (Pardanani *et al*, 2006; Pikman *et al*, 2006; Chaligné *et al*, 2008). El aminoácido 515 forma parte de una región anfipática localizada en el dominio yuxtamembrana que impide la dimerización del receptor en ausencia del ligando. Las mutaciones W515L/K provocan la dimerización del receptor en ausencia del ligando y la activación constitutiva de la vía de

transducción de señales dependiente de este receptor (Pardanani *et al*, 2006; Pikman *et al*, 2006; Chaligné *et al*, 2008). Con propiedades similares, la mutación S505N de *MPL*, descrita previamente en sujetos con trombocitemia familiar (Ding *et al*, 2004), también ha sido encontrada en un número reducido de pacientes con TE (Beer *et al*, 2008).

La frecuencia de las mutaciones W515L/K en los pacientes con TE oscila entre el 1-4,1% para el total y el 3,5-8,5% para aquellos que son V617F negativos (Pardanani *et al*, 2006; Beer *et al*, 2008; Vannucchi *et al*, 2008; Ruan *et al*, 2009). La mutación W515L de *MPL* es más frecuente que la W515K (60-78% en comparación al 22-40%). Sin embargo, la carga mutacional es superior en esta última (Pardanani *et al*, 2006; Beer *et al*, 2008; Vannucchi *et al*, 2008). Las citadas mutaciones se detectaron en 1, 2 u 8 pacientes con TE que eran positivos para V617F (1/411, 0,24%; 2/106, 1,88% ó 8/546, 1,46%), lo que indica que ambas mutaciones no son mutuamente excluyentes, aunque no se ha observado la coexistencia de las mutaciones W515L/K (Pardanani *et al*, 2006; Beer *et al*, 2008; Vannucchi *et al*, 2008). Hay que destacar que en ningún caso se han detectado mutaciones del *MPL* en pacientes con PV, lo que sugiere que estas mutaciones favorecen el desarrollo preferencial de la línea megacariocítica con respecto a la eritroide (Pardanani *et al*, 2006). Esta hipótesis ha sido confirmada por Chaligné *et al* (2007) en un estudio en el que demostraron que la mutación de *MPL* tiene lugar en un progenitor hemopoyético multipotente y que, además, induce una diferenciación megacariocítica espontánea. El papel etiopatogénico de la mutación W515L de *MPL* en la MFP y posiblemente en la TE se ha puesto de manifiesto en un modelo murino en el que los ratones trasplantados con progenitores portadores

de dicha mutación desarrollaban un síndrome mieloproliferativo rápidamente progresivo, caracterizado por leucocitosis, trombocitosis, esplenomegalia y fibrosis medular, pero no eritrocitosis (Pikman *et al*, 2006). A modo de resumen, en la tabla 3 se describen las características biológicas y moleculares de la TE y la PV.

**Tabla 3. Comparación de las características biológicas y moleculares de la TE y PV**

Variable	TE	PV
Niveles hormonales	Normal o ↑TPO	↓ EPO
Unión a su receptor	↓ c-MPL	Normal r-EPO
Crecimiento endógeno de colonias	Megacarocítica, eritroide	Eritroide, megacarocítica
Hiperplasia en médula ósea	Megacarocítica	Panmieloide
Delección 20q y otras alteraciones	5 %	10 %
Mutación V617F de <i>JAK2</i>	60 %	95 %
Carga alélica media	26 ± 15 %	48 ± 26 %
Mayor carga alélica en plaquetas	Sí	No
Homocigosidad	2-4 %	30 %
Dominancia clonal	22 %	53 %
Ratones transgénicos	Nivel bajo de expresión	Nivel alto de expresión
Mutaciones del exón 12 de <i>JAK2</i>	No	4-5 %
Mutaciones del gen <i>MPL</i>	W515L/K, S505N (4 %)	No
Mutaciones del gen <i>TET2</i>	5 %	10-16 %

Modificado de Schafer, 2006.

## **1.2. Complicaciones trombóticas en la trombocitemia esencial**

En la actualidad, como consecuencia de la realización de hemogramas de escrutinio en la población general, una importante proporción de pacientes con TE se diagnostica antes de que la enfermedad haya producido síntomas (del 34 al 67 % según las series) (Besses, 1999; Harrison, 2005). En los pacientes sintomáticos las complicaciones vasculares incluyen, por orden de frecuencia, los síntomas funcionales por alteraciones de la microcirculación, la diátesis trombótica y la hemorrágica (Besses *et al*, 1999; Elliott y Tefferi, 2005; Harrison, 2005). No obstante, la incidencia exacta de estas complicaciones es difícil de establecer, debido a la heterogeneidad de los diferentes estudios en su metodología, seguimiento y tratamiento utilizado en la población estudiada.

### **1.2.1. Incidencia, fenotipo y localización**

#### **1.2.1.1. Alteraciones de la microcirculación**

La clínica microvascular es más frecuente en la TE que en la PV e incluye la eritromelalgia, la isquemia digital y determinados síntomas neurológicos y visuales atípicos característicos (Elliott y Tefferi, 2005; Harrison, 2005). Su incidencia es variable según las series y oscila entre el 4% y 43% de los pacientes, dependiendo de que se hayan estudiado en el momento del diagnóstico o durante su evolución. Estos síntomas, habitualmente de inicio brusco y corta duración, son diversos e incluyen parestesias, afasia, disartria, síncope, vértigo, inestabilidad, cefalea pulsátil, visión borrosa, escotomas, fopsias y ceguera transitoria (Kessler *et al*, 1982; Jabaily *et al*, 1983; Schafer,

1984; Michiels *et al*, 1993 y 1996; Ravandi-Kashani y Schafer, 1997; van Genderen y Michiels, 2004). La eritromelalgia es un síndrome de trombosis microvascular de la arteriola distal que se caracteriza por eritema, congestión y dolor intenso en los dedos o en la planta del pie. Se presenta en forma de episodios recurrentes de dolor quemante, junto a una sensación de calor que se alivia con el frío. Este cuadro clínico no es exclusivo de la TE, ya que puede presentarse en otras NMP, como la PV (Kurzrock y Cohen, 1991). En ausencia de tratamiento, progresa a isquemia acrocianótica y eventualmente a gangrena periférica (Michiels *et al*, 1985 y 2006; Michiels, 1997). Una característica peculiar es su rápida mejoría clínica tras el tratamiento con ácido acetilsalicílico (Michiels *et al*, 1985). En la fisiopatología de la clínica microvascular subyace la formación de microtrombos ricos en plaquetas en las arteriolas distales, además del daño y la proliferación endotelial. Se produce como consecuencia de la activación y agregación plaquetaria *in vivo* durante su paso por las arteriolas de la circulación distal a nivel cutáneo y cerebral (Michiels *et al*, 1985; van Genderen y Michiels, 2004). Tanto el empleo de ácido acetilsalicílico como la reducción de la cifra de plaquetas con tratamiento citolítico consiguen controlar esta sintomatología.

#### **1.2.1.2. Trombosis mayores**

El riesgo global de trombosis para los pacientes con TE es de 6,6% por paciente y año en comparación con el 1,2% por individuo y año para la población control (Cortelazzo *et al*, 1990). En el estudio de Carobbio *et al* (2008), constituido por 1063 pacientes seguidos de forma retrospectiva durante una mediana de tiempo de 4,8 años, la incidencia de trombosis fue de 2,3 %

por paciente y año. Además, es frecuente que la trombosis sea una de las manifestaciones iniciales de la TE. Así, en un estudio retrospectivo de 148 pacientes se registró que el 18% de ellos tenían antecedentes de trombosis en los años previos al diagnóstico de la TE, mientras que en el 12% de los casos la trombosis fue la manifestación inicial de la enfermedad (Besses *et al*, 1999). Las complicaciones trombóticas constituyen la principal causa de muerte en la TE (Passamonti *et al*, 2004). Por ello, el objetivo fundamental del tratamiento en la TE es reducir la frecuencia de dichas complicaciones.

La trombosis es la causa de la muerte en un 26% de los pacientes (Passamonti *et al*, 2004), mientras que la transformación a leucemia aguda, mielofibrosis y las segundas neoplasias suponen el 8%, 4% y el 14% de los fallecimientos, respectivamente (Passamonti *et al*, 2004). En la tabla 4 se muestra la frecuencia de trombosis en el momento del diagnóstico o a lo largo de la evolución de la enfermedad en varias de las series más amplias de TE publicadas. Como puede verse, la frecuencia de trombosis en el momento del diagnóstico (previa o simultánea) osciló entre el 10% y el 29%, mientras que a lo largo de la evolución fue del 8% al 44% (Hehlmann *et al*, 1988; Lahuerta-Palacios *et al*, 1988). Este amplio margen de incidencia se explicaría por la selección de los pacientes, la definición de los episodios trombóticos, la exactitud en la recogida de datos y el efecto del tratamiento recibido. A pesar del citado aumento del riesgo trombótico en los pacientes con TE, la supervivencia global de los enfermos no difiere significativamente de la encontrada en la población normal durante la primera década (Rozman *et al*, 1991; Passamonti *et al*, 2004; Cervantes *et al*, 2008), aunque es inferior a partir de la siguiente década (Wolanskyj *et al*, 2006).

**Tabla 4. Complicaciones trombóticas mayores iniciales y evolutivas en diferentes series de pacientes con TE**

<b>Autor</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Trombosis inicial (%)</b>	<b>Trombosis durante el seguimiento (%)</b>
Bellucci <i>et al</i> , 1986	94	22	17
Cortelazzo <i>et al</i> , 1990	100	11	20
Fenaux <i>et al</i> , 1990	147	18	14
Colombi <i>et al</i> , 1991	103	23	11
Jantunen <i>et al</i> , 1998	170	28	-
Bazzan <i>et al</i> , 1999	187	-	44
Besses <i>et al</i> , 1999	148	25	22
Jensen <i>et al</i> , 2000	96	14	17
Jantunen <i>et al</i> , 2001	132	-	40
Passamonti <i>et al</i> , 2004	435	-	11
Campbell <i>et al</i> , 2005	776	10	8
Chim <i>et al</i> , 2005	231	13	10
Wolanskyj <i>et al</i> , 2005	150	21	31
Dan <i>et al</i> , 2006	381	18	9
Carobbio <i>et al</i> , 2006	439	29	18
Wolanskyj <i>et al</i> , 2006	322	26	-
Alvarez-Larrán <i>et al</i> , 2007	126	-	20
Kittur <i>et al</i> , 2007	176	23	26
Radaelli <i>et al</i> , 2007	306	21	15
Vannucchi <i>et al</i> , 2007	639	18	12
Antonioli <i>et al</i> , 2008	260	10	12
Carobbio <i>et al</i> , 2008	1063	18	11
Carobbio <i>et al</i> , 2008a	657	23	15
Passamonti <i>et al</i> , 2008	605	15	11
Palandri <i>et al</i> , 2009	275	15	8

Entre las trombosis que aparecen tras el diagnóstico de la TE, la arterial es la más frecuente y supone el 70% de las muertes de causa trombótica (Passamonti *et al*, 2004; Elliott y Tefferi, 2005; Campbell *et al*, 2005). En la tabla 5 se muestran los tipos de complicaciones trombóticas registradas durante el seguimiento de 775 y 1063 pacientes afectados de TE (Campbell *et al*, 2005; Carobbio *et al*, 2008).

**Tabla 5. Complicaciones trombóticas durante el seguimiento de dos series de pacientes con TE**

<b>Tipo de trombosis</b>	<b>Campbell <i>et al</i>, 2005 N= 775, n (%)</b>	<b>Carobbio <i>et al</i>, 2008 N= 1063, n (%)</b>
<b>Trombosis arterial</b>	<b>46 (74,1)</b>	<b>84 (71,1)</b>
Cardiopatía isquémica	21 (33,8)	25 (21,1)
Accidente cerebrovascular	15 (24,1)	48 (40,6)*
AIT	12 (19,3)	-
Vasculopatía periférica	3 (4,8)	11 (9,3)
<b>Trombosis venosa</b>	<b>16 (25,8)</b>	<b>34 (28,8)</b>
TVP	10 (16,1)	-
Embolismo pulmonar	5 (8,1)	-
Trombosis esplácnica	2 (3,2)	-
<b>Total</b>	<b>62 (100)</b>	<b>118 (100)</b>

AIT: accidente isquémico transitorio; TVP: trombosis venosa profunda;  
\*Incluyen los accidentes vasculares cerebrales y los AIT.

Como puede observarse, entre las trombosis arteriales la cardiopatía isquémica y la enfermedad vascular cerebral fueron las más frecuentes, pero también fueron habituales las trombosis venosas profundas, el tromboembolismo pulmonar y la vasculopatía periférica (Bellucci *et al*, 1986;



Cortelazzo *et al*, 1990; Fenaux *et al*, 1990; Colombi *et al*, 1991; Jantunen *et al*, 1998 y 2001; Bazzan *et al*, 1999; Besses *et al*, 1999; Jensen *et al*, 2000; Passamonti *et al*, 2004 y 2008; Campbell *et al*, 2005; Chim *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005 y 2006; Dan *et al*, 2006; Carobbio *et al*, 2006, 2008 y 2008a; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Radaelli *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Palandri *et al*, 2009).

La isquemia coronaria en la TE se manifiesta en forma de clínica anginosa o infarto agudo de miocardio y se asocia frecuentemente a factores de riesgo cardiovascular y lesiones coronarias, aunque se ha descrito su aparición incluso en ausencia de coronariopatía evidente (Virmani *et al*, 1979; Scheffer *et al*, 1991; Rossi *et al*, 1998; Ganti *et al*, 2003; Prieto *et al*, 2008; Campo *et al*, 2008).

En torno a un 12,5% de los pacientes con TE presentan manifestaciones neurológicas como forma de presentación de la enfermedad (Arboix *et al*, 1995), destacando entre ellas el accidente isquémico transitorio y el infarto cerebral (Jabaily *et al*, 1983; Michiels *et al*, 1993; Arboix *et al*, 1995). La vasculopatía periférica es una complicación clínica frecuente en la TE y puede manifestarse como isquemia digital o como claudicación intermitente (Salem *et al*, 1980; Bellucci *et al*, 1986; Cortelazzo *et al*, 1990; Fenaux *et al*, 1990; Colombi *et al*, 1991; Jantunen *et al*, 1998 y 2001; Bazzan *et al*, 1999; Besses *et al*, 1999; Jensen *et al*, 2000; Passamonti *et al*, 2004 y 2008; Campbell *et al*, 2005; Chim *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005 y 2006; Dan *et al*, 2006; Carobbio *et al*, 2006, 2008 y 2008a; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Radaelli *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Palandri *et al*, 2009).

La enfermedad tromboembólica venosa y la tromboflebitis superficial son las manifestaciones trombóticas venosas más frecuentes en la TE. Sin embargo, no es inusual la aparición de trombosis en territorios poco habituales, como las venas suprahepáticas, las del eje espleno-portal o los senos venosos cerebrales (Elliott y Tefferi, 2005; Stam, 2005; De Stefano *et al*, 2007). Aunque muy infrecuente, la hemorragia suprarrenal bilateral se ha asociado con la TE. Su mecanismo de aparición consistiría en la trombosis de la microcirculación o vena adrenal y el subsiguiente infarto hemorrágico (Barillari *et al*, 1993; Kojima *et al*, 2002; Michiels *et al*, 2002; Pachipala y Gutknecht, 2006; Arellano-Rodrigo, 2008).

El síndrome de Budd-Chiari (SBC) es una de las complicaciones trombóticas más graves de la TE y se produce como consecuencia de la oclusión trombótica de las venas suprahepáticas que drenan la sangre del hígado a la vena cava inferior (Menon *et al*, 2004). La incidencia de la trombosis de las venas suprahepáticas o del eje espleno-portal en la TE oscila entre el 3 % y el 25 % (Anger *et al*, 1989; Johnson *et al*, 1995; Campbell *et al*, 2005; Elliott y Tefferi, 2005; Alvarez-Larrán *et al*, 2007). En un estudio reciente de la Clínica Mayo, que incluía 460 pacientes, se encontró una incidencia del 4% (Gangat *et al*, 2006). Además, la PV y la TE son la causa más frecuente del síndrome de Budd-Chiari y están presentes en una importante proporción de pacientes con trombosis del eje espleno-portal (TEEP) (Valla *et al*, 1988; Cobo *et al*, 1996; De Stefano *et al*, 1997; Denninger *et al*, 2000; Perelló *et al*, 2002; Brière, 2006). Así, Denninger *et al* (2000) registraron que en el 50% de los pacientes con SBC y en el 30% de los casos de trombosis del eje espleno-portal existía una NMP concomitante, basándose su diagnóstico en los datos

del hemograma, la medición de la masa eritrocitaria por métodos isotópicos, la biopsia de médula ósea y el cultivo de colonias eritroides. Tras el descubrimiento de la mutación V617F de *JAK2* han aparecido diversos estudios en los que se analiza la prevalencia de dicha mutación en los pacientes con SBC y TEEP (Patel *et al*, 2006; Primignani *et al*, 2006; Colaizzo *et al*, 2007; McMahon *et al*, 2007; Regina *et al*, 2007; Kiladjian *et al*, 2008). Kiladjian *et al* (2008) estudiaron un total de 241 pacientes, 104 afectados de SBC y 137 con TEEP, observando la mutación V617F en un 45% de los pacientes con SBC y un 34% de los pacientes con TEEP. Un metaanálisis reciente ha demostrado la estrecha relación existente entre esta mutación y la presencia de este fenotipo particular de trombosis (Dentali *et al*, 2009).

Por otra parte, circunstancias tales como la cirugía, la propia recurrencia del evento trombotico o la gestación pueden exponer a los pacientes con TE a un riesgo aumentado de morbilidad y mortalidad. En un estudio retrospectivo de 311 intervenciones quirúrgicas realizadas en 105 PV y 150 TE, el 7 % de las mismas se complicaron con trombosis o hemorragia mayor a los 3 meses del procedimiento. En esta serie los pacientes con TE presentaban frecuentemente complicaciones tromboticas arteriales (Ruggeri *et al*, 2008). Por su parte, De Stefano *et al* (2008) ha llamado la atención sobre la trombosis recurrente en estos enfermos (235 PV y 259 TE), cuya frecuencia es del 7,6 % por paciente y año y se localiza habitualmente en el mismo territorio que la trombosis previa. Dado que la TE es una enfermedad que afecta predominantemente a las mujeres y que presenta un pico de incidencia en mujeres en edad fértil, no es de extrañar que las complicaciones tromboticas también ocurran durante la gestación. Si a esto se añade que durante la gestación normal existe un

incremento del riesgo trombótico, ello complica el escenario clínico de estas enfermas (Harrison, 2005; Griesshammer *et al*, 2008). Así, una reciente revisión de 291 gestaciones en 160 mujeres con TE ha demostrado un aumento de las complicaciones maternas y fetales. El porcentaje de las gestaciones llevadas a término con éxito eran del 61%, con una incidencia de abortos durante el primer trimestre del 32% y la presencia de complicaciones trombóticas en el 3% de las enfermas (Griesshammer *et al*, 2008). Otras complicaciones obstétricas incluyen la muerte intrauterina, el retraso del crecimiento intrauterino, la *abruptio placentae*, el parto pretérmino y la eclampsia (Harrison, 2005; Griesshammer *et al*, 2008). La trombosis de los vasos placentarios es el factor implicado en la patogenia de estas complicaciones. La experiencia de la Clínica Mayo en 63 gestaciones es similar a las resultados previamente descritos (Gangat *et al*, 2009).

Finalmente, las manifestaciones hemorrágicas son menos frecuentes en la TE (Besses *et al*, 1999; Elliott y Tefferi, 2005; Ruggeri *et al*, 2007; Finazzi y Barbui, 2008). Se asocian a menudo a procedimientos quirúrgicos, al uso de antiagregantes o a la presencia de un síndrome de von Willebrand adquirido tipo 2 en pacientes con trombocitosis extremas ( $> 1.500 \times 10^9/L$ ), debido al consumo de los multímeros de dicho factor (van Genderen y Michiels, 1994; van Genderen *et al*, 1996 y 1997; Budde y van Genderen, 1997; Elliott y Tefferi, 2005).

### **1.3. Patogenia de la trombosis y factores de riesgo trombótico en la trombocitemia esencial**

La trombosis constituye la principal causa de mortalidad y morbilidad en la TE (Passamonti *et al*, 2004; Elliott y Tefferi, 2005; Campbell *et al*, 2005). Así, en nuestro medio, hasta un 18 % de los pacientes tienen antecedentes de episodios trombóticos en los 3 años previos al diagnóstico de la TE, en un 12 % la trombosis constituye la manifestación inicial de la misma y otro 22 % presenta trombosis mayores durante la evolución de la enfermedad (Besses *et al*, 1999). Al objeto de facilitar el estudio de los principales factores involucrados en la patogenia de la trombosis en la TE, los dividiremos en aquellos factores dependientes o independientes de la propia TE, tal como se describen en la tabla 6. Sin embargo, dado que la trombosis es una enfermedad multifactorial (Lowe, 2006), la presencia de un factor de riesgo trombótico debe ser considerada como una parte más en la compleja interacción con otros factores menos evidentes o desconocidos hasta el momento. Desde el punto de vista clínico, una edad superior a 60 años o la historia previa de trombosis son dos de los factores de riesgo trombótico ampliamente reconocidos en esta enfermedad. Sin embargo, el valor pronóstico de otros factores de riesgo vascular, como la hiperlipemia, la hipertensión arterial o la diabetes, varía según los estudios realizados (Besses *et al*, 1999; Finazzi y Barbui, 2008).

**Tabla 6. Principales factores involucrados en la patogenia de la trombosis en la TE**

<p><b>1. Factores independientes de la TE</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Edad</li><li>- Historia de trombosis</li><li>- Factores de riesgo cardiovascular</li><li>- Alteraciones primarias de la coagulación</li></ul>
<p><b>2. Factores dependientes de la TE</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Activación de la coagulación y del endotelio</li><li>- Trombocitosis</li><li>- Alteraciones bioquímicas y funcionales de las plaquetas</li><li>- Leucocitosis</li><li>- Activación leucocitaria</li><li>- Interacción leucocito-plaqueta</li><li>- Clonalidad y mutación V617F de <i>JAK2</i></li></ul>

El aumento en la incidencia de trombosis se ha atribuido clásicamente a la expansión de la masa plaquetaria que caracteriza a la enfermedad (Schafer, 1984; Wehmeier *et al*, 1997). No obstante, también se cree que la leucocitosis existente en algunos pacientes, así como las alteraciones funcionales de las plaquetas y los neutrófilos, podrían desempeñar un papel en la aparición de la trombosis (Schafer, 1984; Wehmeier *et al*, 1997; Falanga *et al*, 2000, 2005 y 2005a; Jensen *et al*, 2000; Carobbio *et al*, 2007, 2008 y 2008a). De este modo, la existencia de una megacariopoyesis clonal acompañada de una hiperreactividad funcional de plaquetas y leucocitos, además de una activación

exagerada del sistema hemostático y endotelial probablemente están relacionadas con la patogenia trombótica de la TE (Bellucci y Michiels, 2006).

### **1.3.1. Factores independientes de la trombocitemia esencial**

#### **1.3.1.1. Edad**

La edad avanzada es, en la población general, un factor de riesgo para el desarrollo de trombosis (Rosendaal, 1999; Lowe, 2006). En la TE también se ha demostrado que la edad avanzada es un importante factor predictivo para la aparición de trombosis. Así, en un estudio clásico de 100 pacientes con TE se encontró una incidencia de trombosis del 1,7% (por paciente y año) en pacientes menores de 40 años, del 6,3% en aquellos con una edad entre 40 y 60 años y del 15,1% en mayores de 60 años (Cortelazzo *et al*, 1990). En nuestro medio, Besses *et al* (1999), en un estudio de 148 pacientes observaron una probabilidad actuarial de trombosis del 35,6 % a los 6 años en enfermos mayores de 60 años y del 21,4% en los menores de esa edad. La edad superior a 60 años aumenta el riesgo trombótico entre 3,3 y 10,3 veces más que el de los pacientes de edad inferior (ver tabla 7, Cortelazzo *et al*, 1990; Besses *et al*, 1999). Sin embargo, también existe un aumento de la frecuencia de complicaciones trombóticas en pacientes jóvenes con TE. Así, en una serie de 126 pacientes con TE diagnosticados a una edad inferior a los 40 años, los accidentes vasculares cerebrales y las trombosis venosas fueron más frecuentes en los enfermos que en la población general (Alvarez-Larrán *et al*, 2007).

**Tabla 7. Estudios que incluyen al menos 100 pacientes con TE y valoran los factores de riesgo trombótico (edad >60 años, trombosis previa o factores de riesgo cardiovascular)**

Autor	N	Factores (Riesgo relativo o P)		
		Edad >60 años	Trombosis previa	FRCV
Cortelazzo <i>et al</i> , 1990	100	10,3 (2,05-51,5)	13 (4,1-41,5)	NS
Colombi <i>et al</i> , 1991	103	NS	P< 0,001	-
Bazzan <i>et al</i> , 1999	187	NS (edad > 55)	-	NS
Besses <i>et al</i> , 1999	148	3,3 (1,5-7,4)	3,0 (1,5-6,0)	4,7 (1,8-11,8) HiperCo
Jantunen <i>et al</i> , 2001	132	NS	-	P= 0,01 Tabaco
Chim <i>et al</i> , 2005	231	P= 0,01	NS	NS
Dan <i>et al</i> , 2006	381	NS	P< 0,01	-
Carobbio <i>et al</i> , 2006	439	2,3 (1,3-3,9) Ambos*		-
Wolanskyj <i>et al</i> , 2006	322	1,51 (1,05-2,18)	2,3 (1,25-4,24) Arterial	NS
Alvarez-Larrán <i>et al</i> , 2007	126	Pacientes jóvenes (< 40 años)	NS	P= 0,02 Tabaco
Radaelli <i>et al</i> , 2007	306	NS	7,6	NS
Tefferi <i>et al</i> , 2007a	605	NS	P< 0,001	NS
Carobbio <i>et al</i> , 2008	1063	1,7 (1,1-2,6) Ambos		-
Carobbio <i>et al</i> , 2008a	657	2,1 (1,2-3,4) Ambos		-
Moreno <i>et al</i> , 2008	128	-	-	3,7 (1,2-10,8) HTA
Passamonti <i>et al</i> , 2008	605	P< 0,001	P= 0,03	-

N: número de pacientes; RR: riesgo relativo (IC al 95%); FRCV: factores de riesgo cardiovascular; NS: no significativo; HiperCo: hipercolesterolemia; HTA: hipertensión; \*ambos factores de riesgo (edad >60 años o/y trombosis previa).



Estos datos sugieren que, además de la aterosclerosis o/y el envejecimiento vascular propios de la edad avanzada, existen otros factores dependientes de la enfermedad que intervendrían en la patogenia de la trombosis de la TE. Por otra parte, hay que destacar que los pacientes con la mutación V617F de *JAK2* tienen por lo general una edad superior a la de aquellos que no presentan la mutación (Antonioli *et al*, 2005 y 2008; Campbell *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005; Cheung *et al*, 2006; Heller *et al*, 2006; Vannucchi *et al*, 2006; Finazzi *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Pemmaraju *et al*, 2007; Speletas *et al*, 2007).

### **1.3.1.2. Historia de trombosis**

En la TE el haber presentado un episodio previo de trombosis es un factor independiente y predictivo para la trombosis recurrente (Cortelazzo *et al*, 1990; Colombi *et al*, 1991; Besses *et al*, 1999; Dan *et al*, 2006; Wolanskyj *et al*, 2006; Radaelli *et al*, 2007; Carobbio *et al*, 2007, 2008 y 2008a; Tefferi *et al*, 2007a; Passamonti *et al*, 2008). En un estudio retrospectivo, la incidencia de complicaciones vasculares mayores fue superior en los pacientes con antecedente de trombosis (13,4% por paciente y año) que en aquellos sin este antecedente (3,4% por paciente y año) (Cortelazzo *et al*, 1990). Así, la existencia de una historia de trombosis aumenta entre 2,3 y 13 veces el riesgo trombótico de estos enfermos (Cortelazzo *et al*, 1990; Besses *et al*, 1999; Wolanskyj *et al*, 2006; Radaelli *et al*, 2007). Por tanto, la coexistencia de una enfermedad vascular parece tener un papel importante en la aparición de trombosis en los pacientes con TE. De hecho, la historia previa de trombosis o una edad superior a 60 años son las principales indicaciones actuales para

iniciar tratamiento citorreductor, independientemente de otros factores asociados (Finazzi y Barbui, 2008).

#### **1.3.1.3. Factores de riesgo cardiovascular**

Hasta hace poco el estudio y la importancia de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) en los pacientes con TE ha recibido escasa atención. Diferentes estudios retrospectivos han evaluado la contribución de estos factores (hipertensión, tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus), plenamente reconocidos en las enfermedades cardiovasculares, con resultados contradictorios, posiblemente a causa del tamaño y la heterogeneidad de los mismos. Como puede observarse en la tabla 7, cuatro estudios han demostrado que la hipercolesterolemia (Besses *et al*, 1999), el tabaquismo (Jantunen *et al*, 2001; Alvarez-Larrán *et al*, 2007) o la hipertensión (Moreno *et al*, 2008) son factores de riesgo trombótico independientes en la TE. Estos hallazgos confirman los resultados de estudios previos con un número menor de pacientes en cuanto al tabaquismo (Watson y Key, 1993) y la hipertensión (Shih *et al*, 2002). Sin embargo, como se aprecia en la tabla 7, la mayoría de las series no han podido demostrar la asociación entre la trombosis y los FRCV estudiados. A la espera de nuevos resultados, parece prudente asumir que los FRCV en la TE se asocian a un riesgo relativo similar al de la población normal (Barbui *et al*, 2004; Landolfi *et al*, 2006; Finazzi y Barbui, 2008).

#### **1.3.1.4. Alteraciones primarias de la coagulación**

Se entiende por trombofilia la tendencia al desarrollo de episodios trombóticos, determinada genéticamente (trombofilia hereditaria) o asociada a

determinados procesos clínicos (trombofilia adquirida). Entre las principales causas de trombofilia se incluyen los déficits de los inhibidores naturales de la coagulación (antitrombina y proteínas C y S), las mutaciones del factor V Leiden y G20210A de la protrombina o la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (anticoagulante lúpico, anticardiolipina o anti-β2-glicoproteína 1) (Middeldorp y van Hylkama Vlieg, 2008). La hiperhomocisteinemia moderada se ha implicado en la patogenia de la tromboembolia venosa y arterial, si bien estudios recientes en que se ha administrado vitamina B12 y folato para reducir los valores de homocisteína no han conseguido prevenir las complicaciones trombóticas (Bonaa *et al*, 2006). Dado que la trombofilia puede ser identificada en aproximadamente la mitad de los pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (Middeldorp y van Hylkama Vlieg, 2008), es posible que su presencia en la TE pudiera tener un papel amplificador del riesgo trombótico. Desgraciadamente, los estudios disponibles sobre este tema son escasos y proporcionan una información limitada, analizando a menudo pacientes con TE y PV conjuntamente. Tres estudios prospectivos analizaron la influencia de la trombofilia hereditaria y adquirida en la incidencia de trombosis en pacientes con TE. Kornblihtt *et al* (2003) estudiaron 60 pacientes sin encontrar una asociación significativa. Sin embargo, en el estudio de De Stefano *et al* (2008), que incluía 494 pacientes (235 PV y 259 TE) y se analizaba de forma específica la recurrencia trombótica, la presencia de un estudio positivo de trombofilia se asoció con un aumento del riesgo trombótico (RR 1,91, IC al 95%: 1,01-3,60), siendo aún mayor en aquellos pacientes de edad inferior a 60 años (RR 2,68, IC al 95%: 1,01-7,16). Por otra parte, en un estudio reciente de 132 enfermos con TE la existencia de un estado

trombofílico (únicamente factor V Leiden o G20210A) determinaba un riesgo aumentado de trombosis (RR 2,70, IC al 95%: 1,55-4,70) (De Stefano *et al*, 2009). No obstante, otros dos estudios de 128 (Moreno *et al*, 2008) y 86 pacientes (43 PV y 43 TE, Afshar-Kharghan *et al*, 2004) que analizaban las mismas mutaciones no mostraron esta asociación. Finalmente, un estudio retrospectivo de 304 pacientes (178 PV y 126 TE) registró un incremento de la prevalencia de la mutación del factor V Leiden en enfermos con historia de trombosis (16%), en comparación con aquellos sin trombosis (3%). Hay que destacar que la presencia de la citada mutación también se asoció a un riesgo aumentado de trombosis recurrente durante el seguimiento de los pacientes (Ruggeri *et al*, 2002). En comparación con sujetos normales, Jensen *et al* (2002) encontraron un incremento significativo de la prevalencia del factor V Leiden en 50 pacientes con NMP (3,4% frente a 9%), mientras que Kornbliht *et al* (2003), en 60 pacientes con TE, observaron una mayor prevalencia de la G20210A (0,7% frente a 5%). En cuanto a esta última mutación de la protrombina, en un estudio prospectivo de 214 enfermos (131 PV y 83 TE) se observó una mayor frecuencia de trombosis venosa en los portadores de la misma (14,7% por 100 pacientes/año frente a 0,8% por 100 pacientes/año en los que no la tenían) (Gisslinger *et al*, 2005). También se ha observado una mayor frecuencia de clínica microvascular en pacientes con TE o PV portadores de la mutación G20210A (Kornbliht *et al*, 2003; Afshar-Kharghan *et al*, 2004).

Varios estudios han encontrado una concentración elevada de homocisteína en pacientes con NMP, posiblemente relacionada con un déficit de ácido fólico/vitamina B o debida a una proliferación mieloide persistente

(Gisslinger *et al*, 1999; Faurschou *et al*, 2000; Amitrano *et al*, 2003). No obstante, en otro estudio realizado exclusivamente en pacientes con TE no se confirmó dicho incremento (Kornblihtt *et al*, 2003). Únicamente un estudio halló su asociación con trombosis arterial (Amitrano *et al*, 2003). Cuatro estudios han evaluado los inhibidores naturales de la coagulación en estos pacientes (Bucalossi *et al*, 1996; Jensen *et al*, 2002; Amitrano *et al*, 2003; Kornblihtt *et al*, 2003). Así, Bucalossi *et al* (1996) describió una disminución de la concentración de estos inhibidores en pacientes con TE y PV que presentaban antecedentes de trombosis, mientras que Amitrano *et al* (2003) observó que una reducción significativa de los niveles de proteína C se asociaba con trombosis del área esplácnica en pacientes con NMP. En comparación con los controles sanos, los pacientes con NMP o TE presentaban concentraciones inferiores de proteína C o proteína S (Bucalossi *et al*, 1996; Jensen *et al*, 2002; Kornblihtt *et al*, 2003).

Finalmente, varios investigadores han encontrado un aumento de la prevalencia de anticuerpos antifosfolipídicos en la TE (Harrison *et al*, 2002; Jensen *et al*, 2002), mientras que otros no lo han confirmado (Kornblihtt *et al*, 2003; Robertson *et al*, 2007). En uno de los estudios se observó la asociación con el antecedente de trombosis (Harrison *et al*, 2002).

### **1.3.2. Factores dependientes de la trombocitemia esencial**

#### **1.3.2.1. Activación de la coagulación y del endotelio**

Un hecho constante en la TE y en otras NMP es la existencia de un aumento de la activación de la coagulación y del endotelio en el torrente

circulatorio. Así lo indicaría el aumento de ciertos marcadores plasmáticos de activación de la coagulación o marcadores de hipercoagulabilidad, tales como el complejo trombina-antitrombina y el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) (Falanga *et al*, 1994 y 2000; Robertson *et al*, 2007; Alvarez-Larrán *et al*, 2008; Alvarez-Larrán, 2008). El F1+2 y la trombina son dos productos generados en cantidades idénticas cuando la protrombina es activada *in vivo*, mientras que la antitrombina es el principal inhibidor de la trombina, con la que forma complejos covalentes. Esta activación del sistema hemostático sobrepasa la capacidad inhibitoria fisiológica, lo que se traduce en un aumento de la generación de trombina y un estado de hipercoagulabilidad.

En cuanto a la activación del sistema fibrinolítico en la TE, existe cierta controversia. El dímero D, producto de la acción fibrinolítica de la plasmina sobre la fibrina, también está aumentado en pacientes con TE, aunque no todos los autores lo han encontrado (Falanga *et al*, 1994 y 2000; Rosc *et al*, 2000; Blann *et al*, 2004; Robertson *et al*, 2007). Además, la formación de complejos plasmina- $\alpha_2$ -antiplasmina, uno de los marcadores de la generación de plasmina está incrementado en pacientes con TE (Rosc *et al*, 2000). En general, se ha constatado una alteración en el balance del sistema fibrinolítico caracterizada por un aumento de los valores del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), además de una disminución del activador tisular del plasminógeno (tPA), lo que favorecería un estado de hipofibrinólisis o resistencia a la fibrinólisis (Cancelas *et al*, 1994; Posan *et al*, 1998; Birdane *et al*, 2005; Kaftan *et al*, 2005). No obstante, algunos autores no han encontrado estas alteraciones o han observado lo contrario (Friedenberg *et al*, 1992;

Bellucci *et al*, 1993; Rosc *et al*, 2000). En dos estudios, los pacientes con complicaciones trombóticas presentaban una concentración superior de PAI-1 plaquetario o plasmático (Bazzan *et al*, 1993; Cancelas *et al*, 1994). El PAI-1 liberado en exceso por las plaquetas o el endotelio durante su activación podría explicar estos hallazgos.

Aunque hay autores que no lo han confirmado, en la TE y PV parece existir de forma concomitante un aumento de marcadores de activación o daño endotelial. Entre ellos destaca la elevación en plasma de la trombosmodulina, el factor de von Willebrand, la E-selectina y la molécula soluble de adhesión vascular (VCAM-1) (Bellucci *et al*, 1993; Falanga *et al*, 1994 y 2000; van Genderen *et al*, 1996a; Musolino *et al*, 1998 y 2000; Randi *et al*, 1999; Cobankara *et al*, 2001; Blann *et al*, 2004; Karakantza *et al*, 2004; Trappenburg *et al*, 2009). Además, hay estudios que sugieren la existencia de disfunción endotelial en estas enfermedades (Schaer *et al*, 1981; Neunteufl *et al*, 2001; Santilli *et al*, 2008; Lessiani *et al*, 2009).

Las causas de la activación de la coagulación y del endotelio en estos pacientes están poco claras, pero las alteraciones en la función plaquetaria y leucocitaria de causa clonal probablemente contribuyen al desarrollo de ambas.

#### **1.3.2.2. Trombocitosis**

La presencia de una trombocitosis superior a  $450 \times 10^9/L$  junto a una proliferación madura de la megacariopoyesis y la mutación V617F u otro marcador clonal, en ausencia de otra neoplasia mieloide o trombocitosis secundaria, es uno de los criterios diagnósticos de TE en la actual clasificación de la OMS (Tefferi y Vardiman, 2008). Dado que la propia trombocitosis define

a esta entidad, se ha pensado que este parámetro, podría tener algún papel en la patogenia de la trombosis de estos enfermos (Walsh *et al*, 1977). Sin embargo, los datos de la literatura no han demostrado una relación entre el recuento de plaquetas y la frecuencia de eventos trombóticos (Bellucci *et al*, 1986; Cortelazzo *et al*, 1990; Fenaux *et al*, 1990; Colombi *et al*, 1991; Jantunen *et al*, 1998 y 2001; Bazzan *et al*, 1999; Besses *et al*, 1999; Jensen *et al*, 2000; Passamonti *et al*, 2004 y 2008; Campbell *et al*, 2005; Chim *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005 y 2006; Dan *et al*, 2006; Carobbio *et al*, 2006, 2008 y 2008a; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Radaelli *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Palandri *et al*, 2009). De hecho, algunos autores han observado complicaciones trombóticas en pacientes con trombocitosis moderada ( $< 600 \times 10^9/L$ ) (Regev *et al*, 1997; Lengfelder *et al*, 1998). No obstante, en el estudio de Carobbio *et al* (2008), constituido por 1063 pacientes seguidos de forma retrospectiva, se observó que recuentos plaquetarios de entre  $650 \times 10^9/L$  y  $1.000 \times 10^9/L$  no se asociaban a riesgo trombótico, mientras que un recuento superior a  $1.000 \times 10^9/L$  tenía un efecto protector para la trombosis. En la tabla 8 se muestra el riesgo relativo para la aparición de trombosis con o sin ajuste para diferentes variables y según el recuento plaquetario en dicho estudio. En este sentido, van Genderen y Michiels (2004), en una revisión de casos de la literatura, observaron que las complicaciones hemorrágicas ocurrían en pacientes con un mayor grado de trombocitosis. Así, se documentaron complicaciones trombóticas en pacientes con recuentos superiores a  $400 \times 10^9/L$ , mientras que las complicaciones hemorrágicas ocurrieron en aquellos con recuentos mayores (entre 800 y  $> 3.000 \times 10^9/L$ ). Una explicación para estos hallazgos sería la presencia de un



síndrome de von Willebrand adquirido en pacientes con TE y trombocitosis extremas (van Genderen y Michiels, 1994; van Genderen *et al*, 1996 y 1997; Budde y van Genderen, 1997; Elliott y Tefferi, 2005).

**Tabla 8. Riesgo relativo de trombosis en 1063 pacientes afectados de TE según el recuento plaquetario (Carobbio *et al*, 2008)**

Variable	Riesgo relativo (IC al 95%), p	
	Plaquetas 650-1.000 x10 <sup>9</sup> /L	Plaquetas >1.000 x10 <sup>9</sup> /L
No ajustada	0,7 (0,4-1,1), p= 0,2	0,5 (0,3-0,9), p= 0,03
Ajustada	0,6 (0,4-1,0), p= 0,1	0,5 (0,3-0,8), p= 0,01
Ajustada y V617F	0,6 (0,4-1,0), p= 0,1	0,6 (0,3-1,1), p= 0,1

Ajustada para sexo, edad > 60 años o trombosis previa, hemoglobina, recuento de plaquetas y tratamiento recibido (citolítico o antiagregante); Ajustada y V617F, las variables previas y la mutación V617F de *JAK2*

Así, es posible que un recuento superior a 1.000 x10<sup>9</sup>/L determine un aumento del riesgo hemorrágico y al mismo tiempo un efecto protector para el desarrollo de trombosis (van Genderen y Michiels, 2004; Carobbio *et al*, 2008). Sin embargo, a pesar de las observaciones previas, existen datos que sugieren que, al menos en pacientes de alto riesgo (esto es, edad > 60 años o antecedentes de trombosis), la disminución del recuento de plaquetas por debajo de 600 x 10<sup>9</sup>/L, puede reducir la incidencia de complicaciones trombóticas. En este sentido, el tratamiento citolítico con busulfán o hidroxiurea, además de conseguir una reducción del recuento de plaquetas, es capaz de disminuir las complicaciones trombóticas en estos pacientes (Michiels *et al*,

1985; Cortelazzo *et al*, 1990 y 1995; Lahuerta-Palacios *et al*, 1988; van Genderen y Michiels, 1995). No obstante, la eficacia antitrombótica del tratamiento citorreductor se atribuiría a mecanismos más complejos que la simple reducción del recuento de plaquetas (Landolfi *et al*, 2006). Así, en el ensayo PT-1, la administración de hidroxiurea más ácido acetilsalicílico fue superior a anagrelida más ácido acetilsalicílico en la supervivencia libre de eventos, lo cual sugiere que el efecto panmielosupresor de la hidroxiurea puede ser la causa de una mayor eficacia antitrombótica (Harrison *et al*, 2005b).

### **1.3.2.3. Alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales de las plaquetas**

En los pacientes con trombocitosis secundarias no se ha observado un aumento en la incidencia de complicaciones trombóticas (Kuo *et al*, 2003; Vannucchi y Barbui, 2007a), lo cual sugiere que en la TE, además del incremento del recuento de plaquetas, deben coexistir otros mecanismos involucrados en la aparición de la trombosis. Así, las anomalías en la morfología, bioquímica y función de las plaquetas son hallazgos frecuentes en la TE, de tal forma que es probable que estas alteraciones desempeñen algún papel en la patogenia de la trombosis. En la tabla 9 se muestran las principales alteraciones descritas en la TE.

El estudio del frotis de sangre periférica demuestra que los pacientes con TE tienen un aumento de la heterogeneidad plaquetaria con respecto al tamaño y la granulación.

**Tabla 9. Principales alteraciones plaquetarias descritas en la TE**

Alteraciones	Variables
Morfológicas	<p>Heterogeneidad plaquetaria</p> <p>Anisocitosis e hipogranularidad plaquetaria</p> <p>Aumento de plaquetas grandes</p> <p>Reducción de gránulos <math>\alpha</math>, cuerpos densos y mitocondrias</p> <p>Dilatación intensa del sistema canalicular abierto</p> <p>Hipertrofia del sistema tubular denso</p> <p>Ausencia o desorganización de los microtúbulos</p>
Bioquímicas	<p>Glucoproteínas y receptores de membrana</p> <p>    Disminución de las glucoproteínas Ib y IIb/IIIa</p> <p>    Aumento de la glucoproteína IV</p> <p>    Reducción de receptores <math>\alpha</math>-adrenérgicos</p> <p>    Reducción de la expresión del c-MPL</p> <p>    Disminución de los receptores de la prostanglandina D<sub>2</sub></p> <p>    Aumento de receptor Fc de las inmunoglobulinas</p> <p>    Disminución de la actividad procoagulante</p> <p>Metabolismo del ácido araquidónico</p> <p>    Aumento de la síntesis de tromboxano</p> <p>    Aumento de la actividad de las fosfolipasas</p> <p>    Disminución de la actividad de la lipooxigenasa</p>
Funcionales	<p>Agregación plaquetaria</p> <p>    Ausencia de agregación a epinefrina</p> <p>    Defecto o ausencia de agregación a colágeno o ADP</p> <p>    Enfermedad adquirida del <i>pool</i> de depósito</p> <p>    Agregación espontánea</p> <p>Activación plaquetaria</p> <p>    Aumento de <math>\beta</math>-tromboglobulina y factor plaquetario 4</p> <p>    Aumento de la trombospondina, P-selectina y CD40 ligando</p> <p>Renovación plaquetaria</p> <p>    Disminución de la supervivencia plaquetaria</p> <p>    Aumento de plaquetas reticuladas</p>

Así, es frecuente la presencia de anisocitosis e hipogranularidad plaquetaria, que se acompaña de un número aumentado de plaquetas grandes (Maldonado *et al*, 1974; Zeigler *et al*, 1978; Cortelazzo *et al*, 1980). Estos pacientes presentan valores elevados de plaquetócrito, volumen plaquetario medio y de la amplitud de distribución del volumen plaquetario cuando se utilizan autoanalizadores (Small *et al*, 1981; Sehayek *et al*, 1988). En el análisis ultraestructural pueden descubrirse plaquetas de tamaño grande o gigante con perfil redondeado y forma irregular o alargada. Las plaquetas circulantes también pueden mostrar alteraciones de las organelas tales como una reducción en el número de gránulos  $\alpha$ , cuerpos densos y mitocondrias, además de grandes agregados de partículas de glucógeno, dilatación intensa del sistema canalicular abierto y la ausencia o desorganización de los microtúbulos e hipertrofia del sistema tubular denso. Con frecuencia se observan gránulos de forma anormal o gigantes e incluso plaquetas nucleadas (Bussi *et al*, 1966; Maldonado *et al*, 1974; Boughton *et al*, 1980; Woodruff *et al*, 1980; Feliu *et al*, 1986; Rozman *et al*, 1990). Todas estas alteraciones ultraestructurales causan una disminución marcada de la densidad plaquetaria (Holme y Murphy, 1984; Järemo, 1999). Tanto en los megacariocitos como en las plaquetas, se han descrito la presencia de partículas retrovíricas (Morgan y Brodsky, 2004). En su mayor parte, el origen de estos hallazgos morfológicos se encuentra en las alteraciones en la ploidía, crecimiento y demarcación durante la megacariopoyesis de la TE, aunque el aumento de la activación plaquetaria en la circulación periférica también puede contribuir.

### **1.3.2.3.1. Glucoproteínas y receptores de membrana**

Se han descrito diversas alteraciones en las glucoproteínas y receptores de membrana de las plaquetas en un porcentaje elevado de pacientes con TE y otras NMP (Schafer, 1984; Finazzi *et al*, 1996; Wehmeier *et al*, 1997; Rao, 2004). Una disminución de la expresión de las glucoproteínas Ib y IIb/IIIa, además de un aumento de la glucoproteína IV es un patrón constante en la TE (Eche *et al*, 1981; Clezardin *et al*, 1985; Mazzucato *et al*, 1989; Mistry *et al*, 1991; Handa *et al*, 1995; Thibert *et al*, 1995; Jensen *et al*, 2000a; Kaplan *et al*, 2000). Es frecuente que las antedichas glucoproteínas de superficie tengan un contenido inferior de ácido siálico (Clezardin *et al*, 1985; Mazzucato *et al*, 1989). Entre ellas, la síntesis de la glucoproteína IIb/IIIa es normal, pero su procesamiento celular es anormal, de modo que causa una disminución de la expresión en superficie y además una alteración en su activación (Kaplan *et al*, 2000). Es por ello que el número de moléculas de fibrinógeno unidas en las plaquetas de estos enfermos es menor, aunque presentan una mayor afinidad en su unión (Landolfi *et al*, 1988; Mazzucato *et al*, 1989; Mistry *et al*, 1991). Jensen *et al* (2000a) demostraron una relación entre el antecedente de trombosis y el aumento de la expresión plaquetaria de la glucoproteína IV.

Un rasgo característico de las plaquetas en la TE es la reducción de la expresión de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Kaywin *et al*, 1978). Además, otros autores también han observado una respuesta anormal del receptor tras su activación (Swart *et al*, 1984; Ushikubi *et al*, 1990). Otro hallazgo constante en la TE es una expresión reducida del c-MPL como se ha comentado previamente en otro apartado de la presente tesis (Horikawa *et al*, 1997; Moliterno *et al*, 1998; Harrison *et al*, 1999a). Por otra parte, cabe destacar una

resistencia plaquetaria a la actividad inhibitoria de la prostanglandina D<sub>2</sub> debido a una disminución marcada de su receptor, lo que indica que este mecanismo de inhibición normal está comprometido (Cooper *et al*, 1978; Cooper y Ahern, 1979; Cortelazzo *et al*, 1988). En otro trabajo también se ha documentado un aumento del número de receptores Fc para las inmunoglobulinas (Moore *et al*, 1981).

Con frecuencia, se ha encontrado una deficiente actividad procoagulante de la membrana plaquetaria en la TE, que se ha puesto de manifiesto mediante la demostración de una disminución de la actividad del factor X y de la expresión del complejo protrombínico (Semeraro *et al*, 1979; Cortellazzo *et al*, 1981; Crook *et al*, 1990; Lee y Baglin, 1995; Presseizen *et al*, 2002). Algunas de las alteraciones descritas pueden en teoría ser causa de trombosis, mientras que otras podrían asociarse a clínica hemorrágica. No obstante, en general, estas alteraciones no se han asociado de forma inequívoca a estas manifestaciones clínicas. Seguramente esto se deba a que las alteraciones por si solas no tengan suficiente entidad como para causar manifestaciones clínicas o que varíen con el tiempo o la evolución de la enfermedad.

#### **1.3.2.3.2. Metabolismo del ácido araquidónico**

Un hallazgo característico en la TE y la PV es la presencia de un trastorno del metabolismo del ácido araquidónico que conlleva un aumento mantenido en la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> (Okuma y Uchino, 1979; Schafer, 1982; Rocca *et al*, 1995). La ciclooxigenasa 1 (COX-1) plaquetaria convierte el ácido araquidónico en tromboxano A<sub>2</sub>, el cual es un potente vasoconstrictor e inductor de la agregación plaquetaria. El ácido acetilsalicílico a dosis bajas es capaz de inhibir su producción y causar una mejoría de la clínica microvascular

de estos pacientes (Michiels *et al*, 1985; Rocca *et al*, 1995; Cortelazzo *et al*, 1998). Aunque la excesiva producción de tromboxano A2 en la TE podría tener un papel importante en la trombosis de estos pacientes, su utilidad clínica todavía no ha sido demostrada. En este sentido, un estudio aleatorizado ha mostrado que el ácido acetilsalicílico a dosis bajas es eficaz en la prevención de la aparición de complicaciones trombóticas en la PV (Landolfi *et al*, 2004). Dicho efecto se ha atribuido a la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria y la consiguiente disminución de la producción de tromboxano A2.

En la actualidad no se conoce el mecanismo que causa un incremento en la síntesis de tromboxano A2. Se sabe que el contenido de fosfolípidos de membrana plaquetaria en la TE no difiere del encontrado en los sujetos normales (César *et al*, 1993; Mayordomo *et al*, 1995). No obstante, las plaquetas de los pacientes con TE tienen un aumento del contenido de proteínas del citoesqueleto y liberan más metabolitos del ácido araquidónico y tromboxano tras el estímulo con trombina que las plaquetas de controles sanos (Maresca *et al*, 1993; Mayordomo *et al*, 1995; Rocca *et al*, 1995). En un principio, estos hallazgos son compatibles con un aumento de la actividad de las fosfolipasas o con una facilitación de la vía de la ciclooxigenasa en las plaquetas de estos pacientes (Mayordomo *et al*, 1995). En un experimento en el que se utilizaba el ionoforo A23187 como activador de la fosfolipasa A2 en plaquetas de TE o controles sanos no se objetivaron diferencias significativas (Vecino *et al*, 2006).

En algunos casos de NMP se ha objetivado un déficit selectivo de la lipooxigenasa plaquetaria, que causa un aumento en la síntesis de tromboxano A2 (Schafer, 1982; Tomo *et al*, 1997). Si bien en estos pacientes se podría

esperar un incremento de las complicaciones trombóticas, paradójicamente se encontró un aumento de las complicaciones hemorrágicas (Schafer, 1982). Sin embargo, en los enfermos con eritromelalgia que presentaban este déficit el tratamiento con ácido acetilsalicílico causaba la normalización de la actividad sintética de la lipooxigenasa, lo que sugiere que no se trataba de un verdadero déficit sino que más bien era consecuencia de la propia activación plaquetaria (van Genderen *et al*, 1994).

### **1.3.2.3.3. Agregación plaquetaria**

En la práctica clínica, la función plaquetaria se valora habitualmente mediante agregometría plaquetaria y el principal objetivo de este estudio es determinar el mecanismo subyacente en la patogenia de la trombosis y la hemorragia de los pacientes con TE. Mediante estos estudios se pretendía identificar a aquellos pacientes con riesgo para el desarrollo de complicaciones trombóticas a fin de realizar un tratamiento preventivo adecuado (Schafer, 1984; Barbui *et al*, 1983; Wehmeier *et al*, 1990; Balduini *et al*, 1991).

Se observa una agregación plaquetaria deficiente en el 35-100% de los pacientes con TE (Tangun, 1971; Neemeh *et al*, 1972; Zucker y Mielke, 1972; Adams *et al*, 1974; Ginsburg, 1975; Cooper *et al*, 1978; Kaywin *et al*, 1978; Nishimura *et al*, 1979; Boneu *et al*, 1980; Fabris *et al*, 1981; Pareti *et al*, 1982; Barbui *et al*, 1983; Bellucci *et al*, 1986; Mitus *et al*, 1990; Baker y Manoharan, 1988; Cortelazzo *et al*, 1988; Hehlmann *et al*, 1988; Sehayek *et al*, 1988; Bazzan *et al*, 1989; Wehmeier *et al*, 1990 y 1989; Balduini *et al*, 1991; Zahavi *et al*, 1991; Handa *et al*, 1995; Raszeja-Specht *et al*, 2001; Niittyvuopio *et al*, 2004; César *et al*, 2005; Zeidman *et al*, 2005; Hattori *et al*, 2008). En frecuencia



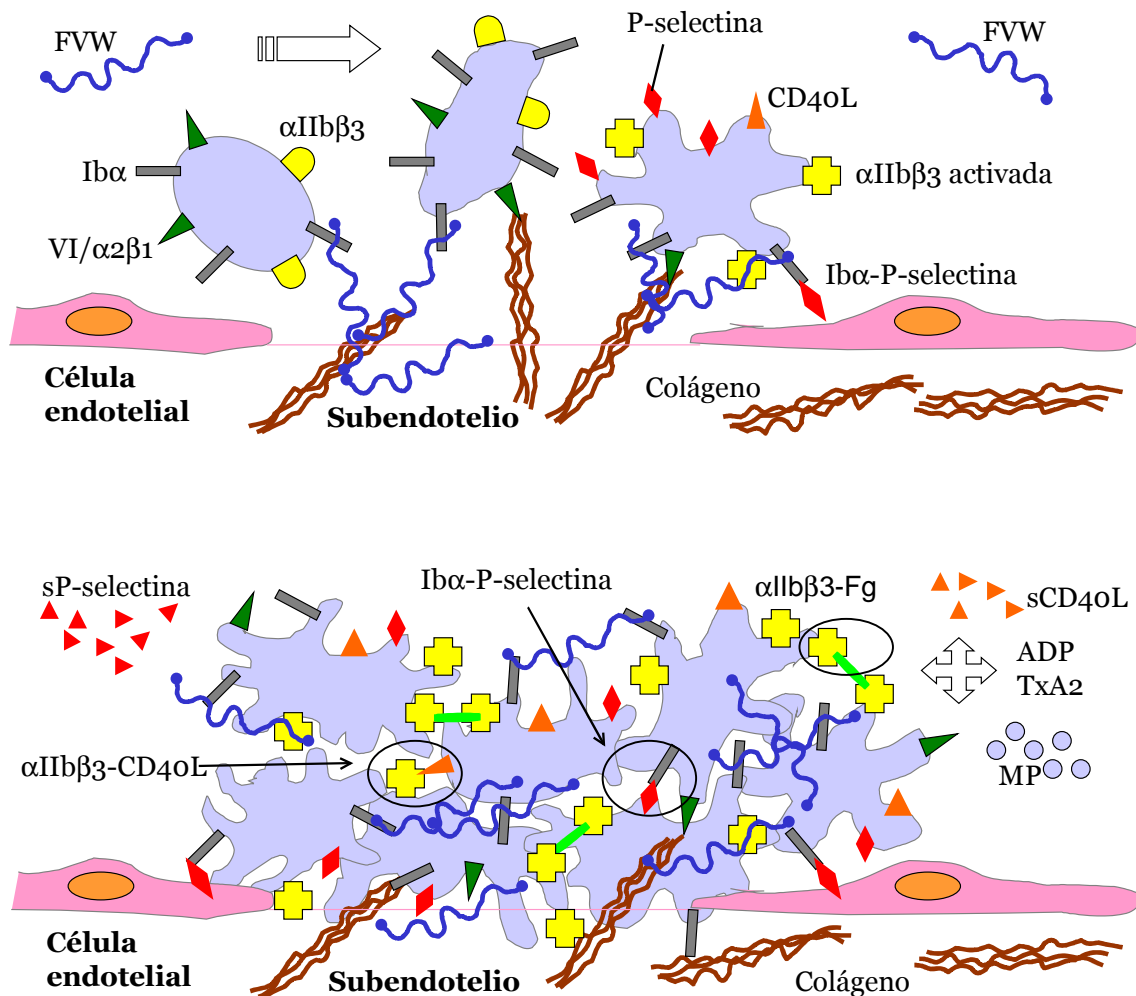
decreciente, la agregación plaquetaria es anormal con epinefrina, adenosín difosfato (ADP) o colágeno, mientras que suele ser normal con ácido araquidónico o ristocetina. En un estudio reciente de 55 pacientes con TE, el 58% tenían respuestas anormales a la epinefrina, el 38% al colágeno y el 11% al ADP (César *et al*, 2005). Los defectos de agregación consisten en una disminución de la agregación máxima, la ausencia de la curva secundaria o la total ausencia de respuesta al agonista. El defecto funcional más característico de las plaquetas en la TE es la disminución o ausencia de respuesta a la epinefrina y es debido a una reducción de la expresión de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Kaywin *et al*, 1978) y su alteración en la transducción de señal y la movilización del calcio intracelular (Swart *et al*, 1984; Ushikubi *et al*, 1990). La enfermedad adquirida del *pool* de depósito (*storage pool disease*) es también un hallazgo frecuente y se caracteriza por desagregación a ADP y disminución de la agregación máxima a epinefrina (Wehmeier *et al*, 1990 y 1989). Probablemente es una manifestación de la disminución del número y contenido de los gránulos  $\alpha$  y cuerpos densos (Tangun, 1971; Nishimura *et al*, 1979; Pareti *et al*, 1982; Yamamoto *et al*, 1984; Lofvenberg y Nilson, 1989; Leoncini *et al*, 1990) por activación anormal de las plaquetas en sangre periférica (Finazzi *et al*, 1996). En este sentido, la tinción con mepacrina de los gránulos densos también ha puesto de manifiesto una reducción del contenido de los mismos en pacientes con NMP (Bermejo *et al*, 2004). Hattori *et al* (2008) no encontraron diferencias en la respuesta agregométrica inducida por ADP o colágeno en las plaquetas de pacientes afectados de NMP con o sin la mutación de JAK2, pero sí hallaron un acortamiento del tiempo de formación del coágulo (r) mediante tromboelastografía en los pacientes con la mutación. Por otra

parte, mediante el uso del analizador de función plaquetaria (PFA) también se han evidenciado alteraciones en la hemostasia primaria de los pacientes con TE (César *et al*, 2005).

La posibilidad de una hiperactividad plaquetaria se sugirió ya hace décadas tras la observación de agregación plaquetaria espontánea (en ausencia de agonistas) o una respuesta exagerada a determinados agonistas en estos enfermos (Vreeken y van Aken, 1971; Wu, 1978; Barbui *et al*, 1973 y 1983; Bellucci *et al*, 1986; Balduini *et al*, 1991; Nurden *et al*, 1996). Desgraciadamente, aunque los estudios agregométricos son a menudo anormales (demostrando hipo o hiperfunción), sus resultados no han mostrado una correlación evidente con las complicaciones trombóticas. Ello se debería a la posible activación plaquetaria inducida por la propia técnica, a la coexistencia de hipo e hiperreactividad plaquetaria en un mismo paciente o a los cambios de los patrones de agregación durante el curso de la enfermedad (Baker y Manoharan, 1988; Balduini *et al*, 1991; Landolfi *et al*, 2006).

#### **1.3.2.3.4. Activación plaquetaria**

La activación plaquetaria es un proceso complejo, que se inicia en la superficie de la membrana tras la interacción de un agonista a su receptor. Después de producirse daño endotelial, las proteínas de la matriz subendotelial quedan expuestas (colágeno y factor de von Willebrand) y el contenido de los cuerpos de Weibel Palade (factor de von Willebrand y P-selectina entre otras) de las células endoteliales se libera inmediatamente a la luz vascular (ver la figura 4).



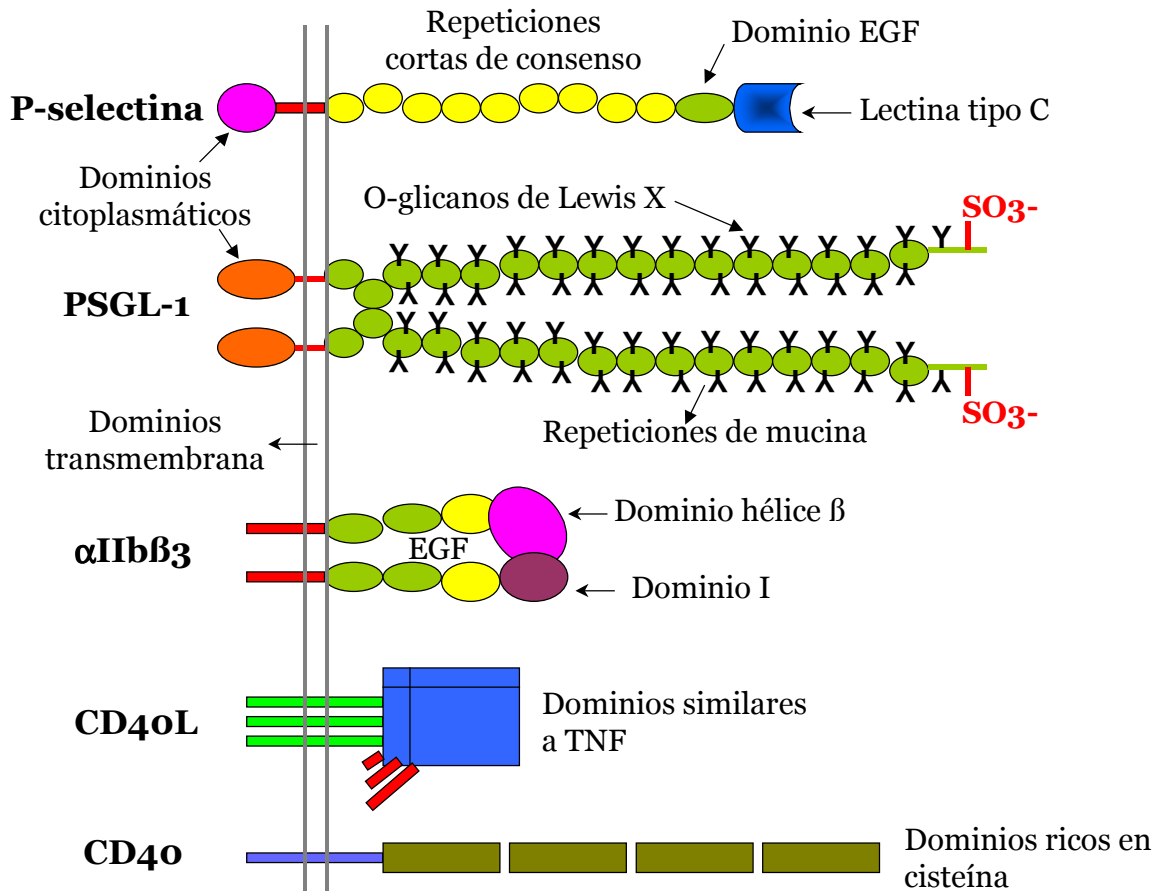
**Figura 4. Adhesión, activación y agregación plaquetaria.** Tras la lesión endotelial se produce la exposición del subendotelio que contiene substratos trombogénicos tales como el factor tisular (no mostrado), el factor de von Willebrand (FVW) y el colágeno. La plaqueta en reposo circula con una morfología discoidea, y tras su activación por contacto con el subendotelio (unión del factor de von Willebrand con la glucoproteína Ib $\alpha$  y del colágeno con las glucoproteínas VI y  $\alpha$ 2 $\beta$ 1), se genera un cambio de forma con la emisión de pseudópodos, degranulación y la expresión de determinadas proteínas de superficie (P-selectina, CD40 ligando y IIb/IIIa o  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activada). Al mismo tiempo se liberan determinados mediadores solubles (P-selectina soluble y CD40 ligando soluble, ADP, tromboxano A2) y micropartículas (MP). Finalmente se produce el tapón plaquetario como consecuencia de la interacción entre las moléculas de adhesión del subendotelio, además de la

unión de la P-selectina con la glucoproteína Iba, el CD40 ligando con la glucoproteína  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  y ésta última con el fibrinógeno (Fg) que contienen las plaquetas activadas (Hagberg y Lyberg, 2000; McEver, 2001; Bennett, 2005; Jackson, 2007; Furie y Furie, 2008).

Ello condiciona la interacción del factor de von Willebrand con la glucoproteína Iba, y la del colágeno con las glucoproteínas VI y  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ , y la subsiguiente activación plaquetaria. Dos vías intracelulares están implicadas en la activación: la de los fosfoinositoles y la metabólica del ácido araquidónico, que se inician con la hidrólisis enzimática de los fosfolípidos específicos de la membrana plaquetaria. Todo este proceso se acompaña de un cambio en la forma de la plaqueta y de la glucoproteína IIb/IIIa, así como de la rápida secreción del contenido de los gránulos (Hagberg y Lyberg, 2000; Flaumenhaft, 2003; Jackson, 2007; Rivera *et al*, 2009). La glucoproteína IIb/IIIa ( $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) activada se unirá con el factor de von Willebrand, el fibrinógeno y la fibronectina para causar agregación plaquetaria y finalmente la formación de un tapón plaquetario (Hagberg y Lyberg, 2000; McEver, 2001; Bennett, 2005; Jackson, 2007; Furie y Furie, 2008).

La plaqueta activada da soporte a las reacciones de coagulación que generan trombina (Monroe *et al*, 2002), expone en su superficie determinadas proteínas y libera micropartículas y mediadores con importantes funciones en la hemostasia primaria, coagulación, inflamación e interacción adhesiva con otras células, tales como la trombospondina, P-selectina, CD40 ligando, factor de crecimiento derivado de las plaquetas,  $\beta$ -tromboglobulina, factor plaquetario 4, factor de von Willebrand, P-selectina soluble, CD40 ligando soluble y entre

otras. En la figura 5 se muestran las principales proteínas de activación y adhesión de las plaquetas.



**Figura 5. Principales moléculas de adhesión y activación plaquetaria.**

Esquema de los dominios de superficie, transmembrana y citoplasmático de la P-selectina, de la PSGL-1 (glucoproteína ligando de la P-selectina), de la glucoproteína  $\alpha IIb\beta 3$  (IIb/IIIa), del CD40 ligando (CD40L) y del CD40. La P-selectina y el CD40L son dos proteínas presentes en los gránulos alfa de las plaquetas que rápidamente se translocan a la superficie plaquetaria tras su activación. Existen dos formas solubles para cada una de estas proteínas: la P-selectina soluble y el CD40L soluble. La P-selectina es la integrina de mayor tamaño y tiene un peso molecular de 140 KDa; la PSGL-1 (homodímero de 240 KDa) es el receptor de la P-selectina y se encuentra fundamentalmente en las plaquetas y en las microvellosidades de los leucocitos participando en la interacción leucocito-plaqueta (Andre, 2004). La glucoproteína  $\alpha IIb\beta 3$  es la principal integrina de la plaqueta, la cual tiene importantes funciones en la

agregación y adhesión celular homotípica y heterotípica por su unión al fibrinógeno, factor de von Willebrand y CD40L (Bennett, 2005). El CD40L (también conocido como CD154) es una glucoproteína de 39 KDa, que junto a su receptor (CD40) tiene importantes funciones en la inflamación, inmunidad, aterosclerosis, activación plaquetaria y estabilización del trombo (Rizvi *et al*, 2008). EGF: factor de crecimiento epidérmico; TNF: factor de necrosis tumoral.

Entre las citadas proteínas, la P-selectina se expresa de forma constitutiva en la membrana interna de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y se trasloca rápidamente a la superficie tras la activación (Andre *et al*, 2000, Andre, 2004). Dicha proteína interviene en la agregación plaquetaria, en la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico y en la desgranulación de los neutrófilos, así como en la génesis de micropartículas leucocitarias ricas en factor tisular, las cuales, a su vez, aumentan la producción de fibrina (Merten *et al*, 2000; Merten y Thiagarajan, 2000; Andre, 2004; Maugeri *et al*, 2006; Furie y Furie, 2008).

Existe una amplia evidencia científica que indica que las plaquetas circulantes de la TE y otras NMP están en un estado de activación continúa en una proporción importante de estos enfermos (Wehmeier *et al*, 1997; Landolfi *et al*, 2006). Así, en la TE, el incremento de la activación plaquetaria *in vivo* se ha demostrado por el aumento de los valores plasmáticos y urinarios de los metabolitos del ácido araquidónico (tromboxano B<sub>2</sub>) y de las proteínas liberadas de los gránulos  $\alpha$  (factor de crecimiento derivado de las plaquetas,  $\beta$ -tromboglobulina y factor plaquetario 4), así como por la presencia de ciertos marcadores de superficie (trombospondina, P-selectina, CD40 ligando y glucoproteína IIb/IIIa activada) (Boughton *et al*, 1978; Cortelazzo *et al*, 1981; Ireland *et al*, 1982; Fabris *et al*, 1984; Burstein *et al*, 1984; Lawler *et al*, 1986; Wehmeier *et al*, 1991 y 1989; Bellucci *et al*, 1993; Gersuk *et al*, 1989; Cahill *et*

*al*, 1996; van Genderen *et al*, 1996a; Griesshammer *et al*, 1999; Jensen *et al*, 2000a; Cahill *et al*, 2001; Raszeja-Specht *et al*, 2001; Viallard *et al*, 2002; Bellucci y Michiels, 2006; Lessiani *et al*, 2009). Además, se ha observado una elevación de micropartículas (de < 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro) con propiedades procoagulantes que expresan marcadores de activación plaquetaria y endotelial (Trappenburg *et al*, 2009). Los gránulos  $\alpha$  de los megacariocitos contienen una concentración normal de  $\beta$ -tromboglobulina en comparación con una concentración más baja en las plaquetas circulantes, lo que indica que la síntesis de esta proteína es normal y se libera como consecuencia de la activación plaquetaria (Grossi *et al*, 1986).

La expresión de trombospondina, P-selectina y CD40 ligando en las plaquetas de los pacientes con TE o NPM están aumentadas si se comparan con controles sanos (Griesshammer *et al*, 1999; Jensen *et al*, 2000a; Cahill *et al*, 2001; Viallard *et al*, 2002; Alvarez-Larrán *et al*, 2008; Lessiani *et al*, 2009). En un estudio de 50 pacientes con NMP encontraron un incremento de la expresión de trombospondina en pacientes con una historia de trombosis (Jensen *et al*, 2000a). Por su parte, Musolino *et al* (2000) observaron que los pacientes con TE afectados de trombosis previa tenían unos valores superiores de P-selectina soluble, aunque estudiaron un reducido número de sujetos. Los pacientes afectados de TE con complicaciones trombóticas o microvasculares tienen una reducción en la supervivencia plaquetaria, además de un incremento de la concentración plasmática o urinaria de marcadores de la activación plaquetaria como la  $\beta$ -tromboglobulina, factor plaquetario 4 y tromboxano B<sub>2</sub>. En estos pacientes, el tratamiento con ácido acetilsalicílico

causa una mejoría clínica y una normalización de estos parámetros de activación plaquetaria (van Genderen *et al*, 1995 y 1999).

Las razones para este aumento de la activación plaquetaria en la TE no son bien conocidas. En la PV, el propio estrés reológico podría tener alguna influencia (Alvarez-Larrán, 2008), pero no explicaría los hallazgos en la TE. Las alteraciones del metabolismo del ácido araquidónico y el origen clonal de las plaquetas podrían estar implicadas en la patofisiología de la disfunción plaquetaria de estos enfermos.

#### **1.3.2.3.5. Renovación plaquetaria**

Las plaquetas reticuladas (reticuloplaquetas) son las plaquetas jóvenes recientemente liberadas al torrente circulatorio (en analogía a los reticulocitos) que contienen RNA mensajero residual (Harrison *et al*, 1997; Harrison y Goodall, 2008; Arellano-Rodrigo, 2009). Es conocido que en la TE existe un incremento de la renovación plaquetaria con el paso de plaquetas jóvenes al torrente circulatorio por disminución de la vida media plaquetaria e hiperproliferación megacariocítica (Wiik *et al*, 1971; Brodsky *et al*, 1972; Branehög *et al*, 1975; Berild *et al*, 1987; Chavda *et al*, 1996; Harrison *et al*, 1997; Robinson *et al*, 1998; Rynningen *et al*, 2006).

Así, con el uso de plaquetas marcadas con radionúclidos se ha constatado que la supervivencia plaquetaria está disminuida (Wilk *et al*, 1971; Brodsky *et al*, 1972; Branehög *et al*, 1975; Berild *et al*, 1987). Aunque poco frecuente en la TE, la propia esplenomegalia puede causar secuestro y eliminación precoz de las plaquetas del torrente circulatorio. Adicionalmente, también se ha propuesto que el incremento de la activación plaquetaria y el



consumo subsiguiente en sangre periférica puede contribuir a una supervivencia menor. Esta hipótesis se ha visto confirmada en los pacientes con TE y eritromelalgia, en los que se observó una disminución marcada de la vida media plaquetaria en comparación con los pacientes sin clínica o trombocitosis secundaria. Además, el tratamiento con ácido acetilsalicílico resultaba en una normalización de la vida media de las plaquetas de los pacientes afectados de eritromelalgia (van Genderen *et al*, 1995). Por otra parte, Rinder *et al* (1988) encontraron un aumento del porcentaje de plaquetas reticuladas en un reducido grupo de pacientes con NMP e historia de trombosis.

Por tanto, podemos concluir que, si bien no se ha podido establecer con claridad una relación entre trombocitosis y/o alteraciones funcionales de las plaquetas y la aparición de trombosis en la TE, los hallazgos anteriormente citados sugieren que las plaquetas probablemente desempeñen un papel en la génesis de la trombosis.

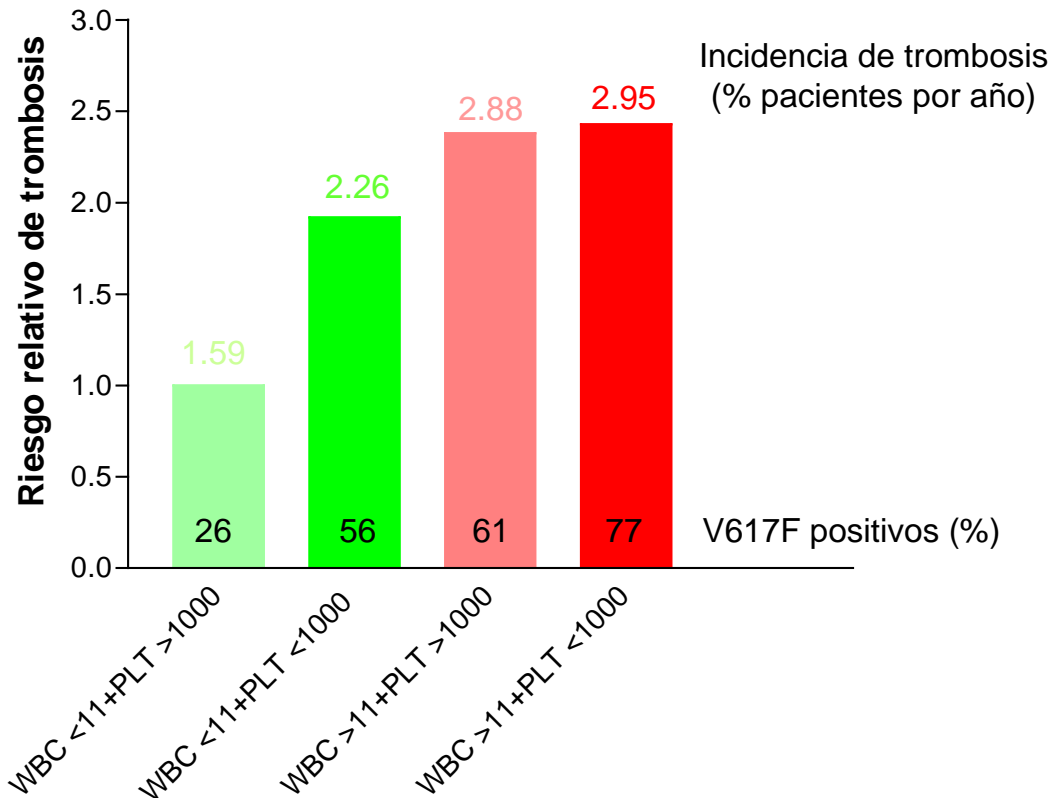
#### **1.3.2.4. Leucocitosis**

En torno al 21% de los pacientes con TE presenta leucocitosis moderada (superior a  $11 \times 10^9/L$ ) (Carobbio *et al*, 2008). Como se observa en la tabla 10, en tres estudios en los que se analizaron los diferentes factores asociados a un mayor riesgo de trombosis en pacientes afectados de TE la leucocitosis resultó ser un factor de riesgo independiente en el análisis multivariado (Carobbio *et al*, 2006, 2008 y 2008a). No obstante, mientras algunos autores han confirmado estos hallazgos (Wolanskyj *et al*, 2006; Hsiao *et al*, 2007), otros no lo han hecho (Tefferi *et al*, 2007).

**Tabla 10. Leucocitosis como factor de riesgo asociado a trombosis en tres series de pacientes con TE**

<b>Estudio</b>	<b>N</b>	<b>Punto corte leucocitosis</b>	<b>Riesgo relativo (IC al 95%), p</b>
Carobbio <i>et al</i> , 2006	439	> 8,7 x10 <sup>9</sup> /L	2,3 (1,4-3,9), p= 0,001
Carobbio <i>et al</i> , 2008a	657	> 10 x10 <sup>9</sup> /L	3,27 (1,54-6,95), p= 0,002
Carobbio <i>et al</i> , 2008	1063	≥ 11 x10 <sup>9</sup> /L	2,0 (1,1-3,6), p= 0,02

Además, se ha observado que el tratamiento con hidroxiurea disminuye el recuento leucocitario en un 30% (de una media de 8,7 x10<sup>9</sup>/L a 6,1 x10<sup>9</sup>/L) y determina que los pacientes con TE de bajo riesgo con leucocitosis tengan un riesgo vascular similar al observado en los pacientes de alto riesgo con un recuento leucocitario normal (RR de 3,1, IC al 95 %: 1,4-7,1 y 2,5, IC al 95 %: 1,0-6,0) (Carobbio *et al*, 2006). Otro aspecto importante a destacar es la interacción entre la trombocitosis y la leucocitosis en el riesgo trombótico de los pacientes con TE (Carobbio *et al*, 2008). Así, considerando a los pacientes con un recuento de leucocitos < 11 x 10<sup>9</sup>/L y trombocitosis > 1.000 x 10<sup>9</sup>/L como grupo de referencia, la incidencia y el riesgo relativo de trombosis y la positividad para V617F aumenta progresivamente (ver figura 6). En cuanto a la relación del recuento leucocitario entre el fenotipo y la localización de la trombosis en la TE, se ha observado que los pacientes con leucocitosis tienen un mayor riesgo de desarrollo de trombosis arterial, en especial cardiopatía isquémica. Sin embargo, su relación con la trombosis venosa o el accidente cerebrovascular no parece clara (tabla 11) (Carobbio *et al*, 2008a).



**Figura 6. Interacción entre la trombocitosis y la leucocitosis y el riesgo trombótico de los pacientes con TE.** Distribución de la incidencia y el riesgo relativo de trombosis, además de la positividad para V617F para diferentes grupos según el recuento plaquetario y leucocitario (Carobbio *et al*, 2008). WBC: leucocitos, > ó < 11 x 10<sup>9</sup>/L, PLT: plaquetas, > ó < 1.000 x 10<sup>9</sup>/L.

Los mecanismos subyacentes que relacionan la propia leucocitosis con la trombosis en estos enfermos no son bien conocidos (Marchetti y Falanga, 2008). En este sentido, estudios epidemiológicos y de laboratorio han atribuido un papel patogénico de los leucocitos como promotores de aterogénesis y trombogénesis (Barbui *et al*, 2009). Además, se ha sugerido que dicha leucocitosis podría empeorar las propiedades reológicas de la sangre en la microcirculación. A pesar de que la propia leucocitosis se relaciona frecuentemente con un hipotético aumento de la activación leucocitaria, todavía

no se ha demostrado (Barbui *et al*, 2009). Con independencia del mecanismo implicado, hay autores que han especulado con la posibilidad de que ciertas alteraciones funcionales de los leucocitos de estos pacientes puedan estar relacionadas con un mayor riesgo trombótico, aunque faltan datos experimentales y clínicos para apoyar esta hipótesis (Marchetti y Falanga, 2008; Barbui *et al*, 2009).

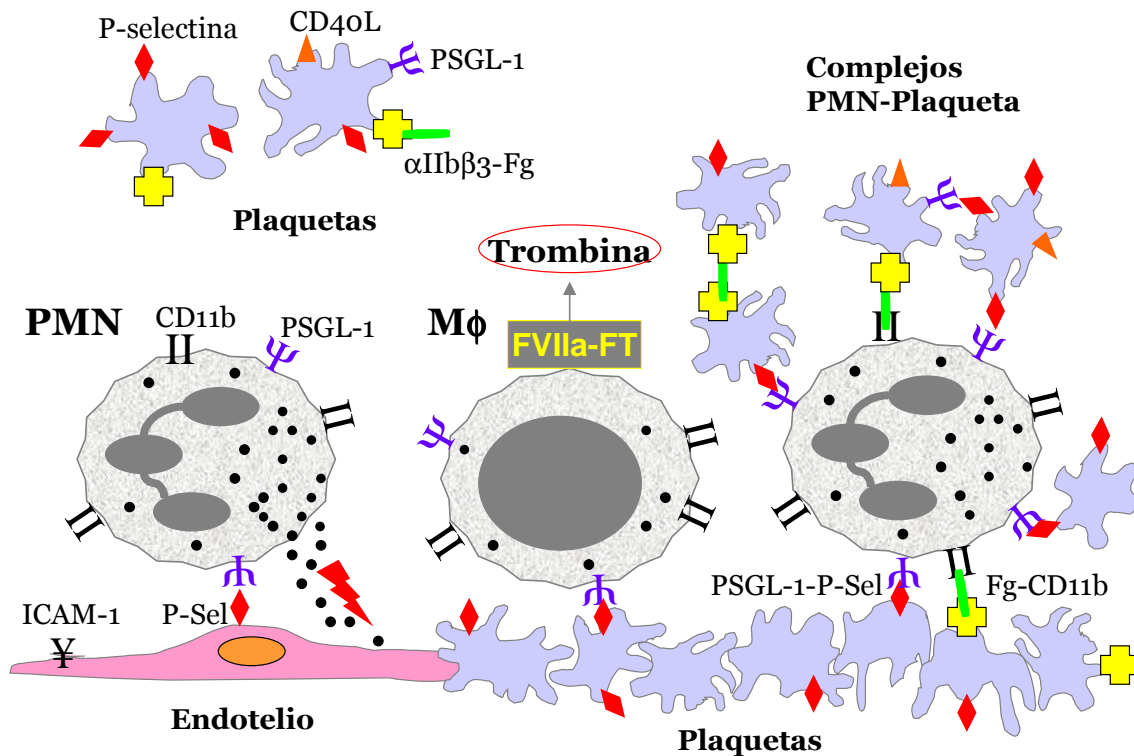
**Tabla 11. Riesgo relativo de trombosis según el fenotipo y la localización de la trombosis en 657 pacientes afectados de TE con un recuento leucocitario superior a  $10 \times 10^9/L$  (Carobbio *et al*, 2008a)**

Variable	Riesgo relativo (IC al 95%)	P
Trombosis arterial	3,12 (1,20-8,08)	0,019
Infarto de miocardio	8,08 (1,0-65,5)	0,05
Accidente cerebrovascular/AIT	1,32 (0,42-4,11)	0,631
Trombosis venosa	2,51 (0,86-7,29)	0,092

AIT: accidente isquémico transitorio.

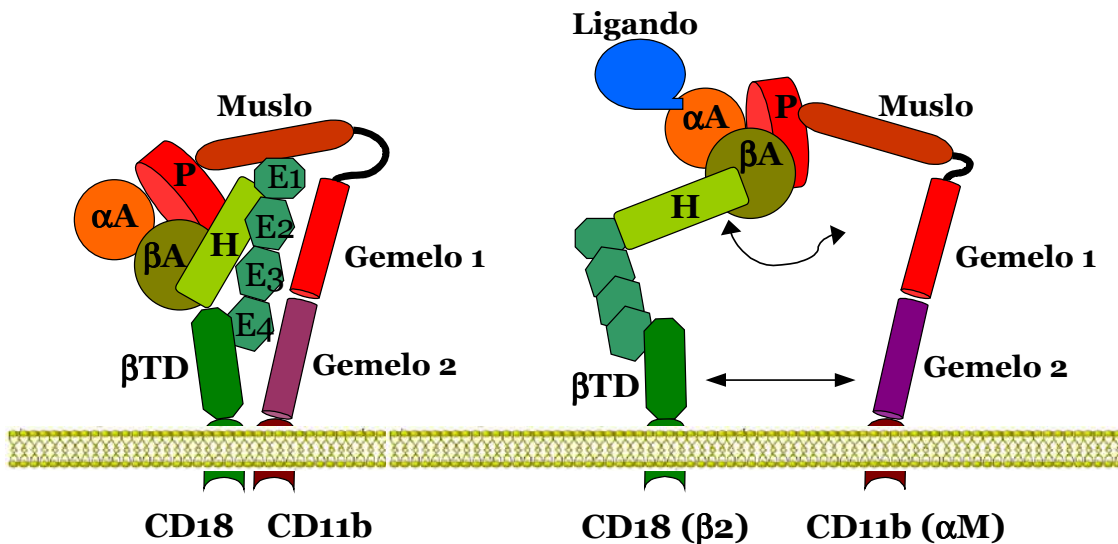
### **1.3.2.5. Activación leucocitaria**

Estudios recientes han demostrado un papel activo de los neutrófilos y los monocitos en los mecanismos de la trombogénesis (Hernández *et al*, 1997; Goel *et al*, 2001; Hoffman y Monroe, 2001; Leone *et al*, 2001; Bouchard y Tracy, 2003; Afshar-Kharghan y Thiagarajan, 2006). Además, el monocito es una célula clave en el modelo actual de la coagulación por su capacidad de expresar factor tisular (ver figura 7) (Hoffman y Monroe, 2001).



**Figura 7. Participación de los leucocitos y de la interacción leucocito-plaqueta en los mecanismos de coagulación y de lesión endotelial.** Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los monocitos (MΦ) activados expresan moléculas de superficie con gran afinidad por sus ligandos, tales como la integrina CD11b/CD18 y la glucoproteína ligando de la P-selectina (PSGL-1) que facilitan la fagocitosis y la adhesión al endotelio (mediante su unión a la ICAM-1 o molécula 1 de adhesión intercelular) y a las plaquetas (P-Sel o P-selectina). Además, los neutrófilos y monocitos pueden degranularse vertiendo su contenido enzimático y dañando el endotelio o afectando a los factores hemostáticos o inhibidores naturales de coagulación. Por otra parte, los MΦ pueden expresar factor tisular (FT) en su superficie, que tras su unión con el factor VII, activan la cascada de la coagulación generando trombina. Por su parte, la plaqueta activada es capaz de interactuar con los leucocitos, formando complejos PMN-plaqueta y monocito-plaqueta, que cumplen importantes funciones en la coagulación y los fenómenos inflamatorios (ver texto). La unión de la PSGL-1 con la P-selectina y la glucoproteína  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (IIb/IIIa) con el fibrinógeno (Fg) y ésta última a su vez con el CD11b son importantes en la formación de estos complejos heterotípicos.

Dado que la TE es una enfermedad clonal, el papel potencial de las alteraciones fenotípicas y funcionales de los leucocitos en la patogenia de la trombosis de esta enfermedad ha recibido escasa atención (Falanga *et al*, 2005a). Los leucocitos sufren cambios funcionales tras ciertos estímulos que conllevan a un proceso de activación y respuesta celular programada. Ello causa degranulación celular y un cambio marcado en la expresión de múltiples proteínas de superficie, la mayoría de las cuales proceden del propio contenido granular leucocitario (Dale *et al*, 2008). Una de las más importantes es la integrina leucocitaria  $\beta_2$ , el CD11b/CD18 (Mac-1), que es un heterodímero formado por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que se encuentran en una configuración cerrada y de baja afinidad para su ligando en estado reposo (figura 8). Al recibir la señal de activación, se produce un aumento de la concentración de moléculas de CD11b, así como la separación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la misma en la membrana leucocitaria, dando lugar a una configuración abierta con una gran afinidad de unión por su ligando, facilitando por tanto, sus propiedades adhesivas y de fagocitosis (Arnaout, 1990; McEver, 2001; Hynes, 2002; Wagner y Frenette, 2008; Maugeri *et al*, 2009). Por ello, se considera al CD11b como marcador del estado de activación de los leucocitos. Esta última se une a la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) del endotelio o al fibrinógeno y es capaz de formar puentes de fibrinógeno entre los leucocitos y la glucoproteína IIb/IIIa de las plaquetas (Arnaout, 1990; Weber y Springer, 1997; Cerletti *et al*, 1999).



**Figura 8. Modelo esquemático de los dominios de la integrina CD11b/CD18 ( $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ ) y su cambio conformacional tras su activación.** La integrina  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$  es el receptor más importante de los leucocitos y participa en las reacciones de adhesión, fagocitosis y respuesta inflamatoria. A la derecha de la figura se puede observar la integrina en reposo (forma cerrada) y a la izquierda la forma activa o abierta. La integrina está formada por dos cabezas y dos piernas. La molécula CD18 (en tonos verdes) está constituida por una cabeza llamada unidad  $\beta\text{A}$  que está unida a una pierna formada por un dominio híbrido (H) similar al de las inmunoglobulinas, seguido de 4 dominios con homología para el factor de crecimiento epidérmico (EGF, E1-E4) y finalmente un dominio  $\beta$  terminal ( $\beta\text{TD}$ ). En el CD11b (en tonos rojizos), la cabeza constituye un dominio propulsor (P) o hélice unido al dominio intermedio o  $\alpha\text{A}$ , y la pierna por el dominio denominado muslo y gemelo 1 y 2. En la molécula en reposo, el  $\beta\text{TD}$  contacta con los dominios  $\beta\text{A}$  e H, y las dos piernas permanecen muy próximas (figura de la izquierda). La unión del ligando al dominio  $\alpha\text{A}$  causa una apertura de la bisagra  $\beta\text{A}$ -H y una extensión y separación de las piernas, así como la transducción de señal. En la actualidad se conocen más de 30 moléculas que son capaces de unirse a esta integrina. Entre ellas, destacan las moléculas de adhesión intercelular, el fragmento C3b del complemento, fibrinógeno, factor X, la glucoproteína Ib, la E-selectina, el colágeno, fibronectina, trombospondina, elastasa o mieloperoxidasa (Yang *et al*, 2002). Modificado de Arnaout *et al* (2007) y Gupta *et al* (2007).

Los leucocitos activados pueden liberar micropartículas, proteasas y radicales libres que, a su vez, pueden alterar el estado funcional de las plaquetas, dañar el endotelio o facilitar la coagulación, induciendo por tanto un estado protrombótico (figura 7) (Pluskota *et al*, 2008). En este sentido, es bien conocido el hecho de que en los individuos normales los neutrófilos activados liberan radicales de oxígeno y proteasas intracelulares que pueden actuar sobre la célula endotelial y las plaquetas (Falanga *et al*, 1999). Concretamente, la elastasa leucocitaria y la catepsina G pueden dañar la membrana endotelial, provocando alteraciones en la producción de prostaciclina, liberación del inhibidor del plasminógeno o proteólisis de la trombomodulina. Además, se ha demostrado que la catepsina G activa directamente las plaquetas y que la elastasa inactiva determinados inhibidores de la coagulación, tales como las proteínas C y S, la antitrombina y el cofactor II de la heparina (Weksler *et al*, 1989; Marchetti y Falanga, 2008) (ver tabla 12).

El gen CD177 o PRV-1, un marcador de la proliferación, liberación y activación del neutrófilo (Stroncek *et al*, 2004), está sobreexpresado en el 50 % de los pacientes con TE (Teofili *et al*, 2002; Kravolics *et al*, 2003; Passamonti *et al*, 2004a; Tefferi *et al*, 2004; Goerttler *et al*, 2005; Bellosillo *et al*, 2006). Los pacientes con TE y un aumento de la expresión del ARN mensajero de este gen tienen un incremento del riesgo trombótico cuando se comparan con los pacientes con una expresión normal del gen (Johansson *et al*, 2003; Goerttler *et al*, 2005a). No obstante, se desconoce si el aumento de la expresión del gen es directamente responsable del incremento de las complicaciones vasculares o simplemente es un marcador de un subgrupo de pacientes con una enfermedad de curso más grave.



**Tabla 12. Efectos sobre el sistema hemostático y el endotelio de las enzimas proteolíticas liberadas de los gránulos azurófilos (elastasa y catepsina G) y de los radicales libres de oxígeno producidos por los neutrófilos activados**

Producto	Efecto
Elastasa Catepsina G	Proteolisis e inactivación de inhibidores naturales Proteína C y proteína S Antitrombina y cofactor II de la heparina Inhibidor de la vía del FT Proteolisis y activación de factores de la coagulación Factor V Factor X Endotelio Lisis y daño endotelial Disminución de la producción de prostaciclina Liberación del PAI-1 Proteolisis del heparán sulfato y trombomodulina Activación plaquetaria
Radicales libres de oxígeno	Inactivación de proteínas de la coagulación Fibrinógeno Factores V, VIII y X PAI-1 y $\alpha_2$ -antiplasmina Endotelio Daño endotelial Liberación de FVW:Ag y trombomodulina Expresión de FT en el monocito

FT: factor tisular; PAI-1: Inhibidor del plasminógeno activado de tipo 1; FVW:Ag: antígeno del factor de von Willebrand. Datos obtenidos de Falanga *et al*, 2000 y 2005; Marchetti y Falanga, 2008.

Falanga *et al* (2000) describieron un aumento de la activación leucocitaria en los pacientes con PV y TE, como demostraba el incremento en la expresión del antígeno CD11b en la membrana de los neutrófilos y el de la fosfatasa alcalina granulocitaria, así como en el contenido de elastasa celular y plasmática. En estos enfermos observaron asimismo un aumento de los marcadores plasmáticos de activación de la coagulación y su correlación con los marcadores de activación de los neutrófilos (CD11b y elastasa). Dichos resultados se añadían a estudios previos que habían puesto de manifiesto la existencia de un fenotipo activado en los neutrófilos de los pacientes con TE (Borregaard *et al*, 1993; Carulli *et al*, 1995 y 1995a). Se ha estudiado asimismo la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos, si bien los resultados han sido contradictorios (Iki *et al*, 1997; Wolach *et al*, 1998). Otros autores también han confirmado el aumento de la expresión del CD11b en los neutrófilos de pacientes con PV, TE y MFP (Burgaleta *et al*, 2002; Alvarez-Larrán *et al*, 2004 y 2008). Passamonti *et al* (2006) describieron un incremento de la fosfatasa alcalina granulocitaria y CD14 en los neutrófilos de los pacientes con NMP y su relación directa con la presencia de la mutación V617F. En este sentido, Puigdecanet *et al* (2008) han demostrado una sobreexpresión de ciertos genes relacionados con la activación del neutrófilo (CD44) y la respuesta inmune en los pacientes con TE y la mutación V617F, lo que sugiere un efecto de esta última en los mecanismos de activación del leucocito.

Sin embargo, en los estudios anteriores no se determinó si existían diferencias en dichos parámetros de activación entre los pacientes con y sin antecedente de trombosis. Nuestro grupo ha demostrado que la expresión del antígeno CD11b granulocitario y el metabolismo oxidativo de los neutrófilos

eran significativamente más altos en los pacientes con PV que en los pacientes sin NMP o los controles sanos (Alvarez-Larrán *et al*, 2004). Además, la expresión del CD11b del neutrófilo, tanto basal como tras estímulo con N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (F-MLP), fue significativamente más elevada en los pacientes con PV y trombosis tipo SBC o TEEP que en los pacientes con PV sin trombosis. Estos resultados sugieren que la activación leucocitaria, y en concreto la sobreexpresión del antígeno CD11b, puede desempeñar un papel en la patogenia del SBC y la TP en la PV. Se podría especular que los granulocitos de los pacientes con PV tienen una capacidad incrementada de inducir daño tisular y, especialmente, endotelial, el cual se vería facilitado por el aumento en la capacidad adhesiva de los granulocitos de la PV gracias a la sobreexpresión de CD11b (Alvarez-Larrán *et al*, 2004).

#### **1.3.2.6. Interacción leucocito-plaqueta**

Existe una evidencia cada vez mayor de que las plaquetas podrían iniciar y propagar procesos inflamatorios y trombóticos a través de su interacción con los leucocitos (figura 7) (Weyrich *et al*, 2003). En este sentido, en individuos normales se ha descrito la presencia en sangre periférica de complejos neutrófilo-plaqueta y monocito-plaqueta, que constituirían una subpoblación de los granulocitos con un perfil inmunofenotípico de activación (Peters *et al*, 1999). Cabe destacar el potencial trombogénico de los complejos monocito-plaqueta, ya que la activación celular puede dar lugar a la síntesis de factor tisular, con la consiguiente activación de la cascada de la coagulación, la cual, a su vez, se vería facilitada por la superficie procoagulante que aporta la plaqueta (Monroe *et al*, 2002). Actualmente se cree que la adhesión entre

plaquetas y leucocitos desempeña un papel importante en los fenómenos trombóticos, ya que se ha observado una estrecha relación entre la activación celular y la adhesión de leucocitos y plaquetas en distintas enfermedades con alto riesgo de trombosis (Faraday *et al*, 2001; Evangelista *et al*, 2007).

Las plaquetas y los leucocitos pueden agregarse a través de diferentes vías adhesivas, todas las cuales requerirían, como primer paso, de la activación plaquetaria, con la consiguiente expresión de P-selectina (Yang *et al*, 1999; Evangelista *et al*, 2007). La P-selectina es considerada un agonista de la activación leucocitaria, de modo que una vez expresada en la superficie celular, se une a su contrarreceptor (glucoproteína ligando de la P-selectina), el cual se expresa de manera constitutiva sobre la superficie leucocitaria, induciendo la transducción de la activación leucocitaria, entre las que se incluyen la activación de la integrina CD11b (figuras 7 y 8) (Yang *et al*, 1999; Evangelista *et al*, 1999 y 2007; Ma *et al*, 2004). En condiciones fisiológicas, la función de la P-selectina es reclutar leucocitos en el lugar de la inflamación o la lesión vascular, permitiendo la migración leucocitaria desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos (Lorant *et al*, 1993). La importancia del efecto de la P-selectina sobre los leucocitos aumentó al observarse que la P-selectina expresada sobre las plaquetas activadas ejercía el mismo efecto que la presente en el endotelio inflamado (Yang *et al*, 1999; Evangelista *et al*, 2007).

Se ha investigado la presencia de complejos leucocito-plaqueta en grupos heterogéneos de pacientes con NMP y en un reducido número de pacientes con TE en los primeros estudios. En ellos se encontraron de forma constante una proporción elevada de complejos neutrófilo-plaqueta y monocito-plaqueta en los pacientes en comparación a los controles sanos (Carulli *et al*,

1995; Kaplar *et al*, 2000; Villmow *et al*, 2003; Alvarez-Larrán *et al*, 2008). Jensen *et al* (2001) observaron que los pacientes con PV y TE tienen un incremento del porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes y que la presencia de estos agregados se correlacionaba con el antecedente de trombosis. Por su parte, Falanga *et al* (2005) objetivaron la existencia de un elevado porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta en los pacientes con TE y PV, así como que la presencia de dichos agregados se correlacionaba con parámetros de activación leucocitaria tales como una mayor expresión de CD11b de membrana. Además, el tratamiento con aspirina disminuía la formación de dichos agregados (Falanga *et al*, 2005).

Maugeri *et al* (2006a), en un estudio en pacientes con PV y TE, demostraron que la expresión de P-selectina y los complejos neutrófilo-plaqueta circulantes se correlacionaban con la desgranulación de los neutrófilos y la presencia de fibrinógeno ligado de forma estable a la superficie leucocitaria, así como con un mayor contenido y expresión extracelular de factor tisular. Además, dichas alteraciones se normalizaron tras tratamiento con hidroxiurea, fármaco capaz de bloquear la unión entre P-selectina y glucoproteína ligando de la P-selectina (PSGL-1).

En resumen, como se puede apreciar en la tabla 13, los pacientes con TE presentan un fenotipo de activación hemostática y celular (plaquetaria, leucocitaria y endotelial) *in vivo* que probablemente condiciona un estado pretrombótico.

**Tabla 13. Parámetros de activación celular y de la coagulación en la TE**

<b>Localización</b>	<b>Parámetros</b>
Coagulación	↑ Complejos trombina-antitrombina ↑ Fragmento 1+2 de la protrombina ↑/N Dímero D ↑ Complejos plasmina- $\alpha_2$ -antiplasmina
Plaqueta	↑ $\beta$ -tromboglobulina y factor plaquetario 4 ↑ Trombospondina, P-selectina y CD40 ligando ↑ Micropartículas, ↑ Síntesis de tromboxano
Neutrófilo	↑ CD11b ↑ Fosfatasa alcalina granulocitaria y ↑ Elastasa ↑ Complejos neutrófilo-plaqueta
Endotelio	↑/N Trombomodulina ↑ Factor de von Willebrand ↑ E-selectina ↑ Molécula soluble de adhesión vascular (VCAM-1)

### **1.3.2.7. Clonalidad y mutación V617F de *JAK2***

Antes del descubrimiento de la mutación V617F de *JAK2* se había observado que las enfermas con TE y patrón de clonalidad del cromosoma X presentaban un incremento del riesgo trombótico (El-Kassar *et al*, 1997; Harrison *et al*, 1999; Chiusolo *et al*, 2001; Shih *et al*, 2001).

Los efectos de la presencia de la mutación V617F sobre el fenotipo clínico en la TE son bastante reproducibles en diversos estudios. Así, aunque no todos los estudios lo han confirmado, en comparación con los pacientes sin la mutación, los enfermos que tienen la mutación se caracterizan por presentar una mayor edad, hemoglobina y recuento leucocitario y un menor recuento

plaquetario, además de una médula ósea hiper celular (Antonioli *et al*, 2005 y 2008; Campbell *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005; Cheung *et al*, 2006; Heller *et al*, 2006; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Pemmaraju *et al*, 2007; Finazzi *et al*, 2007; Rudzki *et al*, 2007; Speletas *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007). Kittur *et al* (2007), en un estudio realizado a partir de material obtenido de laminillas de médula ósea procedentes de 176 pacientes con TE, encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de alelos mutados y el recuento plaquetario, leucocitario o la presencia de esplenomegalia, indicando por tanto una mayor estimulación de la trombocitopoyesis y la mielopoyesis. Sin embargo, un estudio de 260 pacientes con TE no observó esta correlación con los datos del hemograma, pero sí con la esplenomegalia o la edad (Antonioli *et al*, 2008). Estos hallazgos sugieren que los pacientes afectados de TE con la mutación V617F tienen un espectro biológico más cercano a la PV o representan formas incompletas de PV (Campbell *et al*, 2005). Debido a esto, tal vez se podría especular que en los pacientes positivos para la mutación otro factor, como es el aumento de la viscosidad sanguínea, podría contribuir al incremento de riesgo trombótico de forma similar a lo que ocurre en la PV (Spivak, 2002; Kwaan y Wang, 2003; Alvarez-Larrán, 2008; Landolfi *et al*, 2008). En este sentido, en la PV se ha descrito un aumento de la adhesión del eritrocito al endotelio mediada por el CD239 (grupo sanguíneo Lutheran/molécula de adhesión basal, Lu/BCAM), el cual está fosforilado y a su vez se relaciona con la mutación de *JAK2* (Wautier *et al*, 2007). Sin embargo, en un reciente estudio no se ha observado un aumento de la expresión de dicha molécula, aunque utilizando diferente metodología para estudiarla (Hussein *et al*, 2008).

Tras el descubrimiento de la mutación de V617F de *JAK2* se ha investigado si la presencia de la misma se correlaciona con un mayor riesgo para el desarrollo de complicaciones trombóticas (Hexner, 2007; Austin y Lambert, 2008). Dos estudios retrospectivos con 50 y 60 pacientes encontraron una mayor frecuencia de trombosis en pacientes con la mutación (Cheung *et al*, 2006; Heller *et al*, 2006). Además, en el estudio prospectivo PT-1, los pacientes con TE de alto riesgo y la mutación V617 tenían un riesgo mayor de trombosis venosa (RR 4,9, IC al 95%: 1,1-22,3) (Campbell *et al*, 2005). En un reciente estudio de 179 pacientes, la frecuencia de trombosis en pacientes con la mutación era superior a aquellos sin la misma (33% frente a 17%) y similar a la encontrada en la PV (Finazzi *et al*, 2007). Tres estudios con 126, 176 y 260 pacientes demostraron que la presencia de la mutación se asociaba a un mayor riesgo de trombosis arterial, trombosis venosa durante el seguimiento o de trombosis arterial al diagnóstico, respectivamente (Kittur *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Moreno *et al*, 2008). En otro estudio de 132 pacientes con TE se observó un aumento del riesgo trombótico (RR 3,83, IC al 95%: 1,27–11,49) únicamente en aquellos enfermos con una edad inferior a 60 años (De Stefano *et al*, 2009). Sin embargo, en tres estudios retrospectivos con más de 100 enfermos no se ha hallado relación entre la presencia de la mutación y riesgo trombótico (Antonioli *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005; Carobbio *et al*, 2006). La existencia de la mutación es un factor predictivo independiente para el desarrollo de complicaciones durante la gestación en la TE (RR 2.02, IC al 95%: 1,1-3,8 en 62 pacientes con 103 gestaciones, Passamonti *et al*, 2007), aunque otro estudio con un número menor de pacientes (36 pacientes con 63 gestaciones), no ha confirmado este hallazgo (Gangat *et al*, 2009).



Por otra parte, hay que resaltar que los pacientes con la citada mutación y un estado trombofílico (únicamente factor V Leiden o G20210A) tienen un riesgo aumentado de trombosis al diagnóstico (RR 4,57, IC al 95%: 1,88-11,10) cuando se compara con aquellos sin estos hallazgos, lo que sugiere una interacción aditiva entre ambos factores. Esta interacción era más evidente en pacientes con una edad inferior a 60 años (De Stefano *et al*, 2009). Algunas de las limitaciones de estos estudios son su carácter retrospectivo y la heterogeneidad de los mismos y el hecho de que la determinación de JAK2 se había realizado en algunos pacientes al diagnóstico y en otros posteriormente, siendo variable el intervalo de tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la obtención de la muestra. En un intento de dilucidar el significado de la mutación de JAK2 en el riesgo trombótico de los pacientes con TE se han realizado 3 metaánalisis que han mostrado, en general, un aumento del riesgo para el desarrollo de trombosis en este grupo de pacientes, especialmente para la trombosis venosa (Tabla 14).

**Tabla 14. Resultados de 3 metaánalisis sobre el riesgo trombótico que confiere la presencia de la mutación V617F en los pacientes con TE**

Estudio	N	Riesgo relativo (IC al 95%)		
		Trombosis	Trombosis arterial	Trombosis venosa
Ziakas, 2008	2095	1,84 (1,40-2,43)	1,96 (1,43-2,67)	2,09 (1,44-3,05)
Dahabreh <i>et al</i> , 2008	2436	1,83 (1,32-2,53)	1,68 (1,31-2,15)	2,50 (1,71-3,66)
Lussana <i>et al</i> , 2009	3150	1,92 (1,45-2,53)	1,77 (1,29-2,43)	2,49 (1,71-3,61)

Otro aspecto de gran importancia ha sido valorar si la existencia de la mutación de V617F en estado homocigoto, presente en una minoría de pacientes con TE, se relacionaba con una mayor incidencia de trombosis. Vannucchi *et al* (2007) realizaron un estudio en 639 pacientes afectados de TE, 368 de los cuales eran heterocigotos y 14 homocigotos. Los pacientes con mutación de *JAK2* en estado homocigoto presentaron un hematócrito y una cifra de leucocitos más altas al diagnóstico, así como una mayor frecuencia de esplenomegalia que los pacientes heterocigotos, confirmando, por tanto, que el estado homocigoto de *JAK2* en la TE se asocia con un perfil clínico de hiperproliferación. Además, la tasa de incidencia de trombosis fue del 1,3% para los pacientes con la *JAK2* nativa, del 2,1% para los heterocigotos y finalmente del 7,7% para los homocigotos, alcanzando un riesgo relativo de 3,97 veces para estos últimos en comparación con los pacientes sin la mutación (Vannucchi *et al*, 2007). En este sentido, otros estudios también han demostrado una relación entre la presencia de la mutación en estado homocigoto y el riesgo de trombosis arterial (Carobbio *et al*, 2008a; De Stefano *et al*, 2009).

Cuando se cuantifica el porcentaje de alelos mutados para la V617F, dos estudios en pacientes con TE, han demostrado una asociación con la trombosis venosa durante el seguimiento, trombosis arterial al diagnóstico o clínica microvascular (Kittur *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008), mientras que otros dos no lo han confirmado (Pemmaraju *et al*, 2007; Carobbio *et al*, 2008a). La propia edad avanzada y la elevación de la hemoglobina y el recuento leucocitario que caracteriza a los pacientes V617F positivos pueden ser factores de confusión en relación con el riesgo trombótico, especialmente en los pacientes

homocigotos. No obstante, el valor predictivo de la carga alélica se mantiene cuando en el modelo multivariado tiene en cuenta la edad, episodio previo de trombosis o la leucocitosis (Kittur *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Carobbio *et al*, 2008a).

Finalmente, las mutaciones W515L/K en los pacientes con TE se asocian a una menor concentración de hemoglobina y a un mayor recuento de plaquetas en comparación con los pacientes V617F positivos (Beer *et al*, 2008; Vannucchi *et al*, 2008), y a un aumento de la clínica microvascular o de la trombosis arterial cuando se comparan con los pacientes sin ambas mutaciones (Vannucchi *et al*, 2008).



## **II. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



El curso clínico de la TE se caracteriza por un elevado riesgo de aparición de complicaciones tromboticas, las cuales constituyen la principal causa de muerte en estos pacientes. Dado que el objetivo de su tratamiento es prevenir la aparición de esta complicación, la identificación de los pacientes con mayor riesgo de trombosis es importante. Si bien la causa fundamental de la trombosis en esta enfermedad parece ser el aumento del número de plaquetas y sus alteraciones bioquímicas y funcionales, no existe una correlación clara entre estos factores y el desarrollo de trombosis. Por otra parte, estudios recientes sugieren un posible papel al respecto de los leucocitos. Así, se ha comunicado que la presencia de leucocitosis en el momento del diagnóstico de se asocia a un riesgo trombotico mayor, a lo que hay que añadir estudios que demuestran una mayor activación plaquetaria y leucocitaria y un porcentaje mayor de complejos leucocito-plaqueta circulantes en los pacientes con TE con respecto a los individuos sanos. Ciertos estudios han encontrado una correlación entre la activación leucocitaria y la activación de la coagulación en estos enfermos. Todos estos hallazgos sugieren que la activación plaquetaria y leucocitaria puede tener un papel en la patogenia de la trombosis de la TE. Sin embargo, no se han realizado estudios que correlacionen los diferentes parámetros de activación plaquetaria y leucocitaria con el antecedente de trombosis en estos enfermos. Por tanto, la existencia de ese tipo de correlación ha constituido la hipótesis de la presente tesis doctoral.





### **III. OBJETIVOS**



En este contexto, nos planteamos realizar dos trabajos de investigación con los siguientes objetivos:

1. Confirmar si los pacientes con TE presentan una mayor activación plaquetaria, leucocitaria, endotelial y de la coagulación cuando se comparan con controles sanos apareados por edad y sexo.
2. Analizar la renovación plaquetaria, activación plaquetaria y leucocitaria, así como la interacción leucocito-plaqueta y determinados factores de la coagulación en pacientes afectos de TE, con y sin antecedentes de trombosis, a fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos que intervienen en la patogenia de la trombosis en dichos enfermos.
3. Determinar si estos parámetros de activación celular o de la coagulación en los pacientes con TE son, además, factores de riesgo para el desarrollo de trombosis.
4. Investigar si en la TE el antecedente de trombosis o la posible sobreexpresión de dichos parámetros de activación se correlaciona con la presencia de la mutación V617F del gen *JAK2* o con su carga alélica.



## **IV. RESULTADOS**



#### **4.1. TRABAJO 1**

Aumento de la activación plaquetaria y leucocitaria como mecanismo contribuyente a la trombosis en la trombocitemia esencial y su correlación con el estado mutacional de *JAK2*.

**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.





#### **4.1.1. RESUMEN**

La trombocitemia esencial (TE) se caracteriza por una intensa proliferación de la serie megacariocítica, siendo las complicaciones trombóticas una causa importante de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. La identificación de los pacientes con mayor riesgo trombótico es muy importante, ya que el objetivo fundamental del tratamiento es prevenir la aparición de esta complicación. La patogenia de la trombosis no se conoce bien, pero se cree que la causa fundamental es el aumento de las plaquetas, junto con las alteraciones bioquímicas y funcionales de éstas. No obstante, no se ha encontrado una correlación evidente entre estas alteraciones y el desarrollo de complicaciones vasculares. Además, estudios recientes sugieren un posible papel de los leucocitos. Así, se ha descrito un aumento de la activación leucocitaria en los pacientes con TE, demostrado por un incremento en la expresión del antígeno CD11b en la membrana de los neutrófilos y de la fosfatasa alcalina granulocitaria, así como del contenido de elastasa celular y plasmática.

El objetivo de este estudio fue conocer el papel de la activación plaquetaria y leucocitaria en la trombosis de los pacientes con TE. Para ello, se determinó mediante citofluorometría el estado de activación plaquetaria y leucocitaria en 49 pacientes con TE (22 con trombosis previa y 27 sin historia de trombosis) y en un grupo de individuos sanos apareados por edad y sexo. Las determinaciones incluyeron la expresión de P-selectina en plaquetas (en condiciones basales y después del estímulo con ADP, trombina, ácido araquidónico [AA] o colágeno), los complejos plaqueta-neutrófilo y plaqueta-

monocito, el CD11b en neutrófilos y monocitos y la expresión de factor tisular en los monocitos (FTm). Además, se estudió la presencia de la mutación V617F de *JAK2* y se correlacionó con la activación de plaquetas y leucocitos.

En comparación con los controles, los pacientes con TE tenían una mayor expresión de P-selectina basal e inducida por trombina o AA, así como unos valores significativamente más elevados de complejos plaqueta-neutrófilo y plaqueta-monocito, expresión de CD11b en neutrófilos y expresión basal de FTm. La P-selectina plaquetaria, el CD11b monocitario y la expresión de FTm inducida por lipopolisacárido se hallaron significativamente más elevados en pacientes con historia de trombosis que en aquellos sin trombosis. Los pacientes con la mutación V617F de *JAK2* o trombosis tuvieron unos valores más elevados de P-selectina basal e inducida por AA que los pacientes sin esta condición. Además, la expresión del CD11b del neutrófilo y del FTm tras estímulo con lipolisacárido (LPS) fue superior en los pacientes con la mutación.

Estos resultados sugieren que la activación plaquetaria y monocitaria pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de la trombosis de los pacientes con TE. En estos pacientes, la presencia de la mutación V617F de *JAK2* se asocia con una mayor activación plaquetaria.



## Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status

Eduardo Arellano-Rodrigo  
Alberto Alvarez-Larrán  
Juan Carlos Reverter  
Neus Villamor  
Dolors Colomer  
Francisco Cervantes

**Background and Objectives.** The mechanisms accounting for the increased risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia (ET) are not well known. The aim of the present study was to ascertain the role of platelet and leukocyte activation in the thrombosis of ET.

**Design and Methods.** The activation status of platelets and leukocytes was assessed by flow cytometry studies in 49 patients with ET (22 with previous thrombosis and 27 without a history of thrombosis) and in a group of age- and sex-matched healthy individuals. The assessment included platelet P-selectin expression (measured both at baseline and after stimulation with ADP, thrombin, arachidonic acid (AA), and collagen), platelet-neutrophil and platelet-monocyte complexes, determination of CD11b in the neutrophils and monocytes, and expression of tissue factor in the monocytes (mTF). The JAK2 V617F mutation was studied and correlated with platelet and leukocyte activation.

**Results.** As compared with controls, ET patients had significantly higher values of baseline P-selectin and thrombin- and AA-induced platelet P-selectin expression, as well as higher platelet-neutrophil and platelet-monocyte complexes, neutrophil CD11b expression and baseline mTF expression. Platelet P-selectin, monocyte CD11b, and lipopolysaccharide-induced mTF expression was significantly higher in ET patients with a history of thrombosis than in patients without thrombosis. Patients with the JAK2 V617F mutation or thrombosis showed higher baseline and AA-induced platelet P-selectin expression than did those without thrombosis.

**Interpretation and Conclusions.** These results would support a role for platelet and monocyte activation in the thrombosis of ET. In these patients, the presence of the JAK2 V617F mutation is associated with higher platelet activation.

**Key words:** essential thrombocythemia, thrombosis, platelet activation, leukocyte activation, JAK2 mutation.

Haematologica 2006; 91:169-175

©2006 Ferrata Storti Foundation

From the Hematology Department, (EA-R, AA-L, FC), Hemotherapy and Hemostasis Department (JCR), Hematopathology Department (NV, DC), Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondence:  
Francisco Cervantes, MD,  
Hematology Department,  
Hospital Clinic, Villarroel 170,  
08036 Barcelona, Spain.  
E-mail: fcervan@clinic.ub.es

Essential thrombocythemia (ET) is a myeloproliferative disorder associated with an increased tendency to thrombosis.<sup>1,2</sup> Since its treatment is primarily aimed at preventing the appearance of such a complication,<sup>1</sup> identification of patients at higher risk of thrombosis is important. The pathogenesis of the thrombosis in ET is not well known. Thrombocytosis and the morphological, biochemical and functional abnormalities of the platelets are considered possible mechanisms,<sup>3</sup> but no clear correlation has been found between such abnormalities and the occurrence of thrombosis. Based on the presence of an activated neutrophil phenotype, it has been suggested that leukocytes have a role in the thrombosis of ET.<sup>4</sup> Platelets and leukocytes interact and modulate each other's functions. In this sense, an increase in circulating platelet-leukocyte complexes has been observed in subjects with unstable angina, myocardial infarction and stroke.<sup>5,6</sup> Such an increase has also been found in the myeloproliferative disorders, suggesting a role in the thrombosis of ET.<sup>7</sup> Tissue factor (TF), a glyco-

protein synthesized by monocytes and considered the main initiator of blood coagulation and thrombus formation,<sup>8,9</sup> has also been implicated in the thrombosis of several conditions,<sup>9</sup> but information on its role in the thrombosis of ET is scarce.

Recently, a gain-of-function mutation exchanging valine to phenylalanine at position 617 (V617F) of the Janus kinase 2 (JAK2) protein has been identified in most patients with polycythemia vera and half of those with ET or idiopathic myelofibrosis.<sup>10-13</sup> In one study, patients with chronic myeloproliferative disorders harboring the JAK2 V617F mutation had a higher rate of thrombotic complications than those with wild-type JAK2.<sup>13</sup> The aim of the present study was to determine the role of platelet and leukocyte activation in the thrombosis of ET. For such purpose, the activation status of platelets and leukocytes was assessed by flow cytometry studies in patients with and without thrombosis. Additionally, the JAK2 V617F mutation status was studied and correlated with the results of platelet and leukocyte activation.

## Design and Methods

### Patients and diagnostic criteria

Fifty-three patients diagnosed with ET according to the criteria of the Polycythemia Vera Study Group<sup>14</sup> at the Hospital Clínic of Barcelona between 1990 and 2003 were studied. Forty-nine age- and sex-matched healthy individuals served as controls. Thrombosis was defined as a history of major or minor occlusive vascular events. Major events<sup>2</sup> included: (i) central nervous system (CNS) vascular complications, including transient ischemic attacks (TIA), stroke, and retinal vessel thrombosis; (ii) cardiac vascular complications (angina pectoris and myocardial infarction) documented by electrocardiographic and enzymatic findings; (iii) intra-abdominal vascular complications, including Budd-Chiari syndrome and splenic-portal thrombosis,<sup>15</sup> and (iv) peripheral thrombosis, such as intermittent claudication of the legs, peripheral arterial thrombosis, deep venous thrombosis, and pulmonary thromboembolism. Minor events were: (i) erythromelalgia and (ii) superficial thrombophlebitis of the extremities. Microvascular arterial disturbances (acroparesthesias, tinnitus, dizziness, headache or visual complaints) were not considered thrombotic events.

To exclude underlying prothrombotic disorders, all subjects were screened for antithrombin, protein C activity, total and free protein S, plasminogen activity, activated protein C resistance, factor V Leiden mutation, prothrombin gene G20210A mutation, lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies as described elsewhere.<sup>15</sup>

### Samples and reagents

Blood was obtained from an antecubital vein through a 21-gauge butterfly needle with a light tourniquet. After the first 5 mL of blood had been discarded, 4.5 mL of blood were collected into a citrate-containing tube (0.129 M, 3.8%, Vacutainer system, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). All studies were started within ten minutes after sample collection. Phosphate-buffered saline (PBS) was used as universal diluent (pH 7.4, Roche, USA). PE-Cy5 mouse anti-CD42b directed against the platelet glycoprotein Ib was used to identify platelet and leukocyte-platelet complexes and FITC-conjugated mouse anti-human CD62 monoclonal antibody was used to detect platelet P-selectin expression. PE-conjugated mouse anti-human CD11b monoclonal antibody was used for neutrophil and monocyte CD11b expression. Monocytes were identified with FITC-conjugated anti-CD14 monoclonal antibody. Monocyte tissue factor expression was determined by PE-conjugated anti-CD142 monoclonal antibody. Anti-CD42b, anti-CD62, anti-CD11b, anti-CD14 and anti-CD142 were purchased from Becton Dickinson (San José, CA, USA). Irrelevant subclass-matched monoclonal antibodies served as negative controls. Electronic compensation was used to remove spectral overlap and aligned daily with CaliBrite beads (Becton Dickinson). The DNA stain, DRAQ-5 (BioStatus, Shephed, UK), was used to distinguish intact nucleated cells from non-nucleated cells, damaged nucleated cells and cell aggregates. The human thrombin, the tetrapeptide glycyl-L-prolyl-L-arginyl-L-proline (GPRP) and the

lipopolysaccharide (LPS, from *E. coli*, strain 026: B6) were obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Adenosine diphosphate (ADP) and collagen were purchased from Arkray (Aggregpack, Japan) and arachidonic acid (AA) from Menarini Diagnostica (Milan, Italy).

### Platelet P-selectin determination by flow cytometry

For the platelet P-selectin assay, a whole blood flow cytometry method was used as described by Shattil *et al.*<sup>16</sup> and following the recommendations of the European Working Group on Cell Analysis.<sup>17</sup> To minimize artificial platelet activation, no washing, centrifugation or fixation steps were performed. Thus, 5  $\mu$ L of whole blood were aliquoted in a polypropylene tube containing 50  $\mu$ L of PBS solution, anti-CD42b-PE and anti-CD62P-FITC. For the activation assay, ADP (final concentration 10  $\mu$ M), thrombin (0.1 U/mL) plus GPRP (2.5 mM), collagen (10  $\mu$ g/mL) or AA (0.1 mM) were added to diluted whole blood with saturating monoclonal antibodies. After 15 minutes of incubation at room temperature, samples were resuspended in 1 mL of PBS before analysis.

Flow cytometry data were collected on a FACScan (BDIS, San José, CA, USA). Samples were analyzed in a side scatter and the fluorescence data obtained in the logarithmic mode. Single platelet populations were identified in whole blood by their characteristic side scatter and CD42b positivity. Ten thousand events were collected from each sample. Baseline and agonist-induced activation of platelet membrane P-selectin expression was measured in arbitrary units of mean fluorescence intensity (MFI) and as the percentage of positive platelets compared with a negative control. Platelet P-selectin expression was quantified by converting MFI values into molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) units using standardized fluorescent beads (Quantum<sup>TM</sup> FITC and Quantum<sup>TM</sup> PE Medium Level, BangsLabs, USA).

### Determination of platelet-leukocyte complexes

Platelet-neutrophil (PNC) and platelet-monocyte (PMC) complexes were measured by flow cytometry using an adapted no-lyse, no-wash method.<sup>15</sup> Briefly, 125  $\mu$ L of a PBS-diluted blood sample containing  $0.5 \times 10^6$  leukocytes were incubated for 15 minutes at room temperature with anti-CD42b-PE, anti-CD14-FITC and DRAQ-5. Before analysis, 125  $\mu$ L of PBS solution were added to the tube. Neutrophils were selected in a forward versus side scatter dot plot and monocytes were selected in a FL-1 versus side scatter dot plot by gating CD14 positive cells. After gating neutrophil and monocyte populations, PNC and PMC were identified as those events expressing the platelet marker CD42b, selected in a FL-2 versus side scatter dot plot. Results were expressed as a percentage of the neutrophils or the monocytes, respectively.

### Determination of CD11b in neutrophils and monocytes and tissue factor in monocytes by flow cytometry

Neutrophil and monocyte membrane CD11b expression was measured as previously described.<sup>15</sup> Monocyte membrane tissue factor (mTF) expression was measured as described<sup>15</sup> and adapted from the method by Amirkhosravi *et al.*<sup>18</sup> A blood sample containing  $0.5 \times 10^6$

leukocytes was diluted in PBS buffer. For the baseline assay, 125  $\mu$ L of the sample dilution were labeled during 15 minutes at room temperature with anti-CD14-FITC, anti-CD11b-PE and DRAQ-5 for the CD11b determination or anti-CD14-FITC, CD142-PE, and DRAQ-5 for the mTF. For the activation assay, two aliquots were incubated with LPS (10  $\mu$ g/mL at 37°C for 1 hour) and subsequently stained for 15 minutes with anti-CD14-FITC, anti-CD11b-PE and DRAQ-5 or anti-CD14-FITC, anti-CD142-PE and DRAQ-5 for the CD11b and mTF determination, respectively. An acquisition threshold was set in the red fluorescence channel (FL-3) to exclude erythrocytes. Sample acquisition was performed at a low-medium rate (150 events/second). Nucleated cells were labeled with DRAQ-5 and measured through a 670 LP filter (FL-3). Flow cytometric acquisition and analysis of at least 2,500 monocytes were performed. A side scatter *versus* FL-3 dot plot was used to distinguish nucleated cells from erythrocytes and debris, and in this first dot plot a region was created in order to exclude leukocyte aggregates from the analysis. Neutrophils were selected in a forward *versus* side scatter dot plot. CD11b histograms were then obtained from a second gate, selecting CD11b positive events in a FL-2 *versus* side scatter dot plot. Monocytes were selected in a FL-1 *versus* side scatter dot plot by gating CD14 positive cells. For the measurement of CD11b and TF, FL-2 histograms were obtained from gated monocytes. CD11b was measured in MFI arbitrary units and tissue factor also in MFI units and as the percentage of CD14 positive cells staining positive for CD142. The positive delineator was determined by gating 1% background staining on the isotype control fluorescence. As for platelet P-selectin, the expression of neutrophil and monocyte CD11b and monocyte tissue factor was also quantified in MESF units.

#### **Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for JAK2 V617F mutation**

Genomic DNA was extracted from blood samples using a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany). PCR was used to amplify the portion of the JAK2 region that acquires the JAK2 V617F mutation. An amplicon product of 360 bp was generated using primers conjugated with fluorescent dyes JAK2F: (6-FAM) GGTTTCCTCA-GAACGTTGATGG and JAK2R: (5-HEX) CCTAGCTGT-GATCCTGAAACTGAAT and then digested with the BsaXI restriction enzyme (New England Biolabs, Hitchin, UK). Digested products were detected in an ABI 310 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, USA) using the Genescan software. Samples harboring the JAK2 V617F mutation no longer have the BsaXI restriction site.

#### **Statistical methods**

The SPSS 10.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. The results of platelet-leukocyte complexes and platelet P-selectin, neutrophil and monocyte CD11b and tissue factor expression were expressed as the mean and 95% confidence intervals. Differences between groups were analyzed with one-way ANOVA followed by post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test. The  $\chi^2$  test was used to compare categorical variables and the Mann-Whitney U test to com-

pare continuous variables between the groups. All  $p$  values were two-sided.  $p$  values <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **Clinical and hematologic data and JAK2 V617F mutational status**

No patient had protein C, protein S, plasminogen or antithrombin deficiency. Four patients with thrombosis were excluded from the study because they were demonstrated to have a thrombophilic factor (two cases each of prothrombin gene G20210A mutation carriership and antiphospholipid antibodies). Therefore, 49 patients (26 males and 23 females, median age 68 years, range: 28-91) were finally analyzed. The median plasma concentrations of natural anticoagulants did not differ in the two ET groups (*data not shown*). In three patients the diagnosis of ET and the thrombosis were simultaneous, in two the thrombosis preceded the diagnosis of ET, whereas in the remaining 17 it was a complication of a known ET. Table 1 summarizes the vascular events registered in 22 ET patients. In 19 patients it was a major complication and it affected the arterial circulation in the same number of cases. The median interval between ET diagnosis and blood sampling was 86 months (range: 16-231) for patients with thrombosis and 59 months (range: 11-210) for patients without thrombosis ( $p$  not significant). The median interval between thrombosis and blood sampling was 61 months (range: 4-154). No patient was studied during the acute phase of the thrombosis. At the time of study, patients were receiving different therapies (Table 2). Controls had higher hemoglobin concentrations and, leukocyte, neutrophil and monocyte counts than had patients, probably related to the use of hydroxyurea, whereas patients had significantly higher platelet counts.

The JAK2 mutation was detected in 21 out of 50 assessable patients (42%). At diagnosis, ET patients with the JAK2 mutation had higher hemoglobin levels than those without the mutation (140 g/L, 95% CI: 134-146 vs 131 g/L, 95% CI: 128-135,  $p=0.01$ ). Age, sex, disease duration and proportion of patients with a history of thrombosis were not different depending on the presence or not of the mutation.

### **Baseline and agonist-induced platelet P-selectin expression**

As shown in Table 3, in unstimulated samples, ET patients with thrombosis had a significantly higher percentage of platelets expressing P-selectin than had patients without thrombosis and controls ( $p=0.0001$  for both comparisons). Thrombin-induced stimulation increased the percentage of platelets expressing P-selectin in ET patients ( $p=0.001$ , Table 3). Following AA activation, ET patients with thrombosis had a significantly higher mean percentage of platelet P-selectin expression than had patients without thrombosis and controls ( $p=0.0001$ , Table 3). AA-induced platelet P-selectin expression in MESF units was significantly higher in ET patients than in the controls ( $p=0.0001$ , *data not shown*), but no differences were observed between patients with

**Table 1. Occlusive vascular events in 22 patients with essential thrombocythemia.**

	Number of patients (%)*
Erythromelalgia	6 (27)
Transient ischemic attack	6 (27)
Stroke	4 (18)
Myocardial infarction	4 (18)
Intermittent claudication	3 (14)
Deep vein thrombosis	3 (14)
Superficial thrombophlebitis	2 (9)
Budd-Chiari syndrome	2 (9)

\*Some patients had more than one type of event: erythromelalgia and myocardial infarction (n=2), deep venous thrombosis, pulmonary thromboembolism and intermittent claudication (n=1), deep venous thrombosis and pulmonary thromboembolism (n=1), myocardial infarction and intermittent claudication (n=1), recurrent superficial thrombophlebitis and deep venous thrombosis (n=1), superficial thrombophlebitis and transient ischemic attack (TIA) (n=1), and recurrent TIA and stroke (n=1).

and without thrombosis. No differences in P-selectin expression between patients and controls were observed following stimulation with ADP or collagen (Table 3).

**Platelet-leukocyte complexes**

ET patients had higher percentages of circulating PNC and PMC (Table 4,  $p=0.0001$ ) but no difference was found between patients with and without thrombosis. A positive correlation was seen between P-selectin expression and both PNC ( $R=0.529$ ,  $p=0.01$ ) and PMC percentages ( $R=0.470$ ,  $p=0.01$ ).

**Leukocyte CD11b expression**

The results of neutrophil and monocyte CD11b expression are shown in Table 4. Significant differences were detected among the three groups in the baseline CD11b leukocyte expression. Patients with thrombosis showed higher monocyte baseline CD11b expression than did patients without thrombosis and controls ( $p=0.0001$  for all comparisons, Figure 1). Although ET patients had a significantly higher neutrophil CD11b expression than had the controls, the expression was not significantly higher in patients with thrombosis. Following LPS activation, an increase in CD11b expression was seen in the three groups, with ET patients showing the highest values (Table 4).

**Monocyte tissue factor expression**

When expressed in MESF units, mTF expression was higher in the two ET groups both at baseline and following LPS activation (Table 5). LPS activation increased mTF expression in all groups, but the percentage of positive monocytes was higher in patients with thrombosis than in those without thrombosis and in the controls ( $p=0.0001$  in all cases, Figure 2).

**Correlation between JAK2 mutation and platelet and leukocyte activation**

The results of platelet and leukocyte activation in ET patients according to JAK2 mutational status are shown in Table 6. As can be seen, the median percentage of platelets expressing P-selectin both at baseline and after stimulation with AA were significantly higher in patients with the mutation than in those with the wild-type allele

**Table 2. Treatment administered to 49 patients with essential thrombocythemia (ET).**

	ET without thrombosis (n=27)	ET with thrombosis (n=22)
No therapy	3 (11%)	1 (5%)
Cytolytic drug	23 (85%)	21 (95%)
Hydroxyurea	13 (48%)	14 (64%)
Anagrelide	3 (11%)	4 (18%)
<sup>32</sup> Phosphorus	7 (26%)	3 (14%)
Aspirin (100 mg)	4 (15%)	8 (36%)
Ticlopidine	1 (4%)	4 (18%)
Acenocoumarol	3 (11%)	4 (18%)

Data presented are number of patients (percentages are given in parentheses). There were no significant differences between the two groups using the  $\chi^2$  test.

**Table 3. Percentages of platelets expressing P-selectin at baseline and after agonist-induced activation in healthy controls and ET patients.**

	Controls (n=49)	ET without thrombosis (n=27)	ET with thrombosis (n=22)	p value*
Baseline	3.1 (2.7-3.5)	4.7 (3.8-5.5)	6.3 (5.4-7.1)	0.0001°
ADP	51 (48-55)	57 (51-62)	56 (50-63)	NS
Thrombin	38 (33-46)	55 (46-64)	54 (46-63)	0.001
Collagen	9 (8-11)	9 (8-11)	10 (8-12)	NS
Arachidonic acid	37 (30-45)	63 (53-73)	81 (73-89)	0.0001°

Values given as mean and 95% confidence intervals (in parentheses); NS: not significant; ADP: adenosine diphosphate; \*one-way ANOVA test followed by post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test for paired comparisons; the p values refer to the comparisons between controls and ET patients with or without thrombosis; °significant difference among the three groups.

**Table 4. Platelet-leukocyte complexes and neutrophil and monocyte CD11b expression in healthy controls and ET patients.**

	Controls (n=49)	ET without thrombosis (n=27)	ET with thrombosis (n=22)	p value*
PNC	17 (13-22)	56 (52-63)	60 (53-67)	0.0001
PMC	33 (28-41)	81 (75-88)	85 (78-91)	0.0001
Baseline CD11b				
Neutrophil	32 (27-37)	84 (63-106)	93 (70-115)	0.0001
Monocyte	62 (53-72)	128 (111-146)	157 (138-177)	0.0001°
LPS-induced CD11b				
Neutrophil	178 (161-187)	280 (248-312)	303 (259-348)	0.0001
Monocyte	162 (157-189)	244 (215-272)	263 (230-295)	0.0001

PNC (platelet-neutrophil complexes) and PMC (platelet-monocyte complexes) are given as percentages and CD11b in MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) units  $\times 10^3$ ; Values given as mean and 95% confidence intervals (in parentheses); LPS: lipopolysaccharide; \*one-way ANOVA test followed by post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test for paired comparisons; the p values refer to the comparisons between controls and ET patients with or without thrombosis; °significant difference among the three groups.

(Figure 3A and 3B). Moreover, baseline, thrombin- and AA-induced platelet P-selectin expression in MESF units were significantly higher in ET patients with the mutation than in those without (data not shown). Higher values of platelet-leukocyte complexes and leukocyte CD11b and mTF expression were observed in ET patients with the JAK2 mutation when compared with those with the wild-type, but the difference did not reach statistical sig-

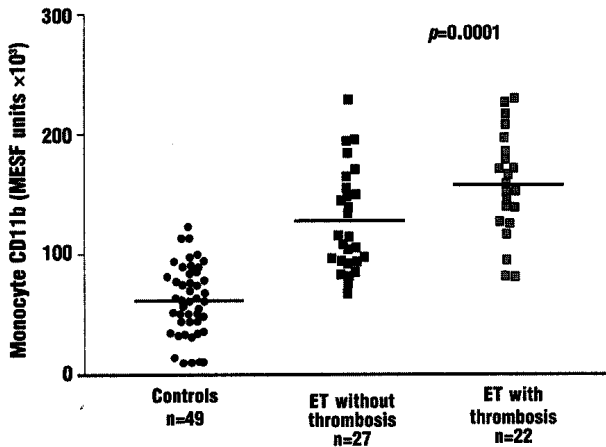


Figure 1. Baseline monocyte CD11b expression from the three groups in molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) units. The horizontal lines represent the median values.

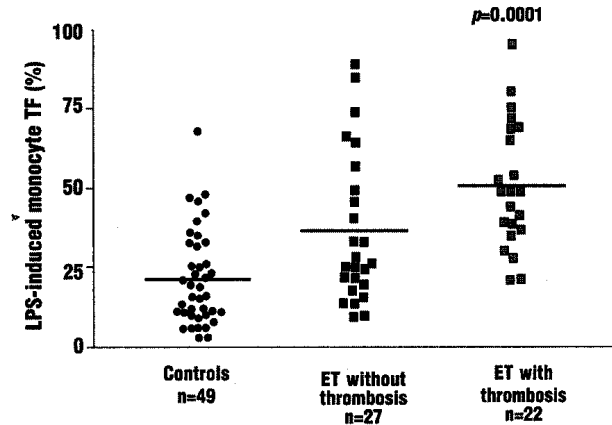


Figure 2. Percentage of monocytes expressing tissue factor (TF) after lipopolysaccharide (LPS) activation in the three groups in study. The horizontal lines represent the median values.

Table 5. Baseline and LPS-induced monocyte tissue factor expression in healthy controls and ET patients.

	Controls (n=49)	ET without thrombosis (n=27)	ET with thrombosis (n=22)	p value*
<b>Baseline</b>				
%	7 (4-8)	10 (6-14)	9 (7-12)	NS
MESF	9 (8-10)	15 (14-17)	14 (13-15)	0.0001
<b>Lipopolysaccharide</b>				
%	21 (16-26)	36 (27-46)	51 (42-60)	0.0001 <sup>o</sup>
MESF	10 (10-11)	18 (16-20)	19 (17-22)	0.0001

Values given as mean and 95% confidence intervals (in parentheses) and expressed as percentage of positive monocytes and as intensity of the expression in MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) units  $\times 10^3$ ; NS: not significant; \*one-way ANOVA test followed by post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test for paired comparisons; the p values refer to the comparisons between controls and ET patients with or without thrombosis; <sup>o</sup>significant difference among the three groups.

Table 6. Comparison of platelet and leukocyte activation parameters of ET patients with and without the JAK2 V617F mutation.

	Wild-type JAK2 (n=29)	JAK2 V617F (n=21)	p value
<b>Platelet P-selectin, %</b>			
Baseline	4.7 (4-5)	6.4 (5-7)	0.006
ADP	54 (49-59)	61 (54-67)	NS
Thrombin	56 (49-64)	53 (41-62)	NS
Collagen	9 (7-11)	10 (9-12)	NS
Arachidonic acid	63 (53-73)	80 (72-87)	0.03
Platelet-neutrophil complexes, %	57 (51-62)	59 (52-66)	NS
Platelet-monocyte complexes, %	82 (77-88)	84 (77-90)	NS
Baseline neutrophil CD11b, MESF	81 (63-99)	92 (65-118)	NS
Baseline monocyte CD11b, MESF	135 (118-151)	148 (125-171)	NS
Baseline monocyte TF, %	8 (5-11)	9 (6-11)	NS
LPS-induced monocyte TF, %	41 (33-49)	43 (32-55)	NS

Values given as mean and 95% confidence intervals (in parentheses) and expressed as percentage or as intensity of the expression in MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) units  $\times 10^3$ ; NS: not significant; ADP: adenosine diphosphate; LPS: lipopolysaccharide; TF: tissue factor.

nificance (Table 6). Following LPS activation, neutrophil CD11b expression was higher in patients with the mutation ( $310 \text{ MESF} \times 10^3$ , 95% CI: 263-358) than in those without ( $267 \text{ MESF} \times 10^3$ , 95% CI: 241-294) and in the controls ( $178 \text{ MESF} \times 10^3$ , 95% CI: 161-187) ( $p=0.0001$  for all comparisons). In addition, LPS-induced mTF expression in MESF units was significantly higher in ET patients with the mutation ( $19 \times 10^3$ , 95% CI: 17-22) than in those without ( $17 \times 10^3$ , 95% CI: 15-19) and in the controls ( $10 \times 10^3$ , 95% CI: 9-11) ( $p=0.0001$ , for all comparisons). No influence of treatment modality, type of thrombosis or presence of recurrent thrombosis was noted for any of the parameters analyzed in the study (i.e., the platelet and leukocyte activation parameters and the JAK2 mutational status).

## Discussion

P-selectin (CD62P) is constitutively expressed on the internal membrane of the  $\alpha$  granules of the platelets and is translocated to the platelet surface upon stimulation.<sup>19</sup> It may be involved in platelet-platelet and shear-induced

platelet aggregation<sup>19</sup> and in the genesis of leukocyte-derived microparticles containing active tissue factor that enhance fibrin deposition.<sup>20</sup> In the present study, the platelets of ET patients with thrombosis showed an increased P-selectin membrane expression at baseline and after AA-induced activation. This is in keeping with the results of a recent study in patients with myeloproliferative disorders and arterial thrombosis<sup>21</sup> and supports a role for platelet activation in the genesis of thrombosis in ET. This could be explained by the clinical and experimental evidence of increased cyclo-oxygenase platelet activity and thromboxane A<sub>2</sub> generation in ET.<sup>3,22,23</sup> In the present study, a significant increase in P-selectin expression was observed in ET patients following thrombin stimulation. In this sense, Jensen *et al.*<sup>24</sup> found decreased MESF P-selectin expression following platelet activation induced by either ADP or thrombin receptor activating peptide (TRAP) in both ET and polycythemia vera, a disparity that might reflect differences in patient selection or in the flow cytometry methods used. In the present study, patients with ET had higher percentages of circulating PNC and PMC than the controls. Besides, a positive

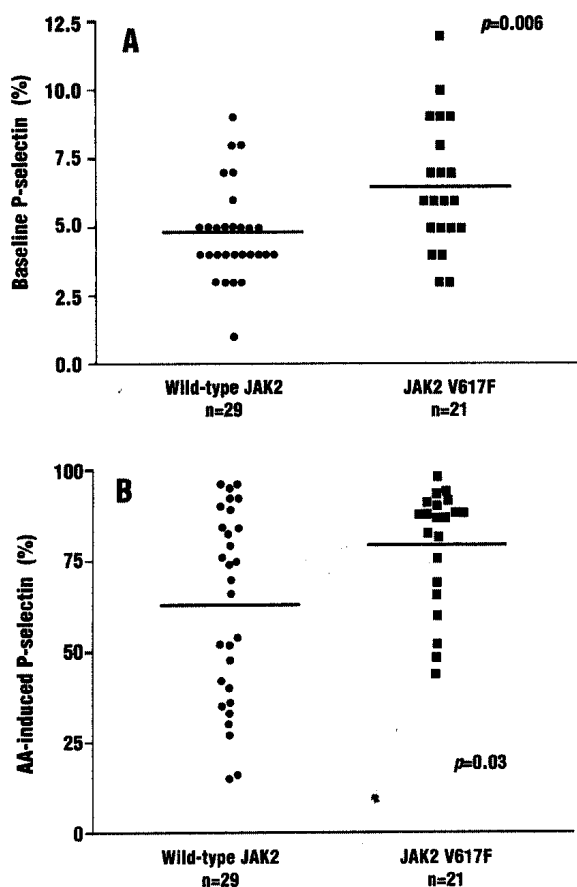


Figure 3. Flow cytometry quantification of platelet P-selectin expression at baseline (A) and following arachidonic acid (AA) activation (B) in ET patients based on the mutational status of JAK2. The horizontal lines represent the median values.

correlation was found between P-selectin percentage, platelet count, and circulating PNC and PMC, in agreement with results recently reported in patients with myeloproliferative disorders.<sup>7,15,25</sup> Enhanced platelet-leukocyte interaction is known to facilitate leukocyte adhesion, activation and tissue factor transfer between monocytes and platelets.<sup>8,9,26,27</sup>

Integrin CD11b is the  $\alpha_M$  subunit of the CD11b/CD18 ( $\alpha_M \beta_2$ , Mac-1) heterodimer responsible for firm attachment of the leukocytes to endothelium and platelets.<sup>28</sup> Upon activation, the leukocytes upregulate membrane CD11b expression promoting their adherence to the endothelium, phagocytosis, homotypic aggregation, adhesion-dependent respiratory burst, and degranulation.<sup>26,28</sup> In addition, the phagocytes, especially monocytes, are involved in the process of fibrin deposition and modulate the activation of blood coagulation through the release of TF, proteases and reactive oxygen species.<sup>27</sup> Baseline monocyte CD11b expression was significantly higher in ET patients with thrombosis. Increased baseline neutrophil CD11b expression was also observed in ET patients, although those with thrombosis did not have a higher expression. It is possible that the increase in leukocyte and platelet activation contributes to the local lesion of the endothelium and/or the progression of the coagu-

lation reactions by engagement of the adhesion receptors and release of proteases or cytokines. Data on mTF expression in ET are scarce.<sup>29</sup> In our study, ET patients had higher mTF expression than had the controls, and patients with thrombosis had a higher percentage of monocytes with LPS-induced TF expression. Since the monocyte is considered a key cell in the coagulation process,<sup>27</sup> our data suggest that increased mTF expression can be important in the pathogenesis of the thrombosis in ET. It could be hypothesized that up-regulation of the phagocyte CD11b antigen could be due to the clonal hematopoietic proliferation of ET. In this sense, mTF overexpression would reflect both cell activation status and CD11b up-regulation. Enhanced monocyte-platelet interaction would be a second possibility.<sup>9,19,20</sup>

The frequency of the JAK2 V617F mutation observed in our patients was similar to that reported by other authors.<sup>10-13,30-32</sup> The lack of association between the JAK2 mutation and the incidence of thrombotic events is in agreement with the findings of two recent studies in ET patients.<sup>31,32</sup> A significant association between the JAK2 mutation and increased baseline and thrombin- or AA-induced platelet P-selectin expression was found in the present study. This observation would suggest a possible JAK2-mediated effect on platelet P-selectin expression and is consistent with the presence of JAK2 in human platelets and its subsequent phosphorylation on challenge with thrombin.<sup>33</sup> The current evidence of the role of thrombopoietin in platelet activation and its enhanced response after agonist stimulation via the JAK2 pathway signaling<sup>34</sup> could explain in part our findings. Besides, ET patients with the JAK2 mutation showed higher expression of neutrophil CD11b and mTF in MESH units after LPS stimulation, which would be consistent with the involvement of JAK2 in LPS-induced leukocyte activation.<sup>35</sup>

Although in our study no differences in P-selectin, CD11b or mTF expression were seen depending on the use of hydroxyurea, a lower incidence of arterial thrombosis has recently been reported in ET patients treated with hydroxyurea plus low-dose aspirin as compared to in those receiving anagrelide plus low-dose aspirin.<sup>36</sup> Whether increased P-selectin, CD11b or mTF could identify ET patients at higher thrombotic risk remains to be confirmed in prospective studies.

In conclusion, ET patients with previous thrombosis show a marked increase in platelet and especially monocyte activation, whereas the presence of the JAK2 mutation is associated with higher platelet activation in these patients. Such alterations might play a role in the pathogenesis of the thrombosis of ET but further studies are required to ascertain whether such findings could identify ET patients at greater thrombotic risk.

*EAR carried out the flow cytometry studies, collected the data, performed the statistical analysis, and wrote the manuscript; AAL helped in the design of the study and collection of the data; NV contributed to the flow cytometry studies; JCR performed the coagulation studies; DC performed the JAK2 analysis and FC designed the study and contributed as a senior author to writing the paper. Eduardo Arellano-Rodrigo is a recipient of an Emili Letang post-Fellowship Research Award from the Hospital Clinic. Authors declare that they have no potential conflict of interest.*

*Manuscript received June 29, 2005. Accepted November 7, 2005.*



## References

- Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2005; 128:275-90.
- Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Sole F, Hernandez-Boluda JC, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999; 13:150-4.
- Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 1:71-8.
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; 96:4261-6.
- Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KAA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105:2166-71.
- McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient attack. *Br J Haematol* 2004; 125: 777-87.
- Jensen MK, de Nully P, Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased circulating platelet-leukocytes aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol* 2001; 66: 143-51.
- Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1015-22.
- Østerud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological role. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9:S9-S14.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365:1054-61.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJR, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7:387-97.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005; 434:1144-8.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352:1779-90.
- 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, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997; 34:29-39.
- Alvarez-Larrán A, García-Pagán JC, Abalde JG, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, et al. Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004; 124:329-35.
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70:307-15.
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79:885-96.
- Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, Francis JL. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood cytometric assay. *Thromb Haemost* 1996; 75:87-95.
- André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004; 126:298-306.
- Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004; 10:171-8.
- Karakantza M, Giannakoulas NC, Zikos P, Sakellaropoulos G, Kouraklis A, Aktypi A, et al. Markers of endothelial and in vivo platelet activation in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Int J Hematol* 2004; 79:253-9.
- Rocca B, Ciabattoni G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1225-30.
- van Genderen PJJ, Prins FJ, Michiels JJ, Schrör K. Thromboxane-dependent platelet activation in vivo precedes arterial thrombosis in thrombocythemia: a rationale for the use of low-dose aspirin as an antithrombotic agent. *Br J Haematol* 1999; 104:438-41.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000; 110:116-24.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005; 33: 523-30.
- McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86:746-56.
- Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1:464-9.
- Yakubenko VP, Lishko VK, Lam SC-T, Ugarova TP. A molecular basis for integrin  $\alpha$ Mb2 ligand binding promiscuity. *J Biol Chem* 2002; 277:48635-42.
- Bazzan M, Vaccarino A, Stella S, Foli C, Omede P, Gallone G, et al. Procoagulant activity of mononuclear cells is increased in myeloproliferative and myelodysplastic diseases. *Haemostasis* 1996; 26:157-63.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2162-8.
- Antonili E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19:1847-9.
- Wolansky AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131:208-13.
- Rodríguez-Liñares B, Watson SP. Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett* 1994; 352:335-8.
- Tibles HE, Navara CS, Hupke MA, Vassilev AO, Uckun FM. Thrombopoietin induces P-selectin expression on platelets and subsequent platelet/leukocyte interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:987-91.
- Okugawa S, Ota Y, Kitzawa T, Kakayama K, Yanagimoto S, Tsukada K, et al. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285:C399-C408.
- Harrison CN, Campbell P, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005; 353:33-45.



## **4.2. TRABAJO 2**

Renovación plaquetaria, factores de coagulación y marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial en la trombocitemia esencial: relación con la presencia de trombosis y la carga alélica V617F de *JAK2*.

**Arellano-Rodrigo E**, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *American Journal of Hematology* 2009; 84: 102–108.



#### 4.1.1. RESUMEN

La trombocitemia esencial (TE) es una neoplasia mieloproliferativa caracterizada por trombocitosis y la presencia de la mutación V617F del gen *JAK2* en la mitad de los pacientes. La trombosis es la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes y existe evidencia reciente que implica a la activación plaquetaria y leucocitaria en la patogenia de estas complicaciones. Además, estudios recientes sugieren un posible papel de la renovación plaquetaria, de la resistencia adquirida a la proteína C activada (RAPCA) y de las concentraciones de los factores de coagulación y marcadores solubles de activación plaquetaria en la patogenia de ciertas enfermedades trombóticas.

Con la finalidad de dilucidar los mecanismos involucrados en la génesis de la trombosis de los pacientes con TE, en 53 pacientes con TE (26 con historia de trombosis previa) y en otros tantos sujetos sanos de igual edad y sexo se determinaron el porcentaje de plaquetas reticuladas (PR), la RAPCA, la expresión plaquetaria de factor tisular (FT) y las concentraciones plasmáticas de FT, factores de coagulación, P-selectina soluble (sP-selectina), CD40 ligando soluble (sCD40L), antígeno del factor de von Willebrand (VWF:Ag), trombomodulina soluble (sTM), dímero D y fragmento 1+2 de la protrombina. Estos parámetros se correlacionaron también con la carga mutacional de *JAK2*.

Los pacientes con trombosis previa tenían valores significativamente más elevados que los pacientes sin trombosis y controles para el porcentaje de PR, RAPCA y las concentraciones plasmáticas del factor V, factor VIII, VWF:Ag, sP-selectina y sCD40L. En el estudio multivariado, el porcentaje de

PR, la concentración de factor V y la presencia de RAPCA se asociaron independientemente con un aumento del riesgo de trombosis. Los pacientes con la mutación de *JAK2* mostraron una disminución de la concentración de proteína S (PS) libre y un aumento de FT, sP-selectina, sCD40L y VWF:Ag en comparación con aquellos sin la misma. Finalmente, se objetivó un efecto dosis del porcentaje mutacional ( $\geq 12\%$ ), asociándose éste a una mayor concentración de FT, sP-selectina, sCD40L, FVW:Ag y menor de PS.

Los anteriores resultados sugieren un papel de la renovación plaquetaria, factor V y RAPCA en la trombosis de la TE, así como la posibilidad de la detección de pacientes con un mayor riesgo trombótico. La asociación entre la carga alélica de V617F con la disminución de PS o incremento de FT y de los marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial sugiere que dicha mutación podría promover un estado pretrombótico en la TE.

# Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and *JAK2* V617F allele burden

Eduardo Arellano-Rodrigo,<sup>1</sup> Alberto Alvarez-Larrán,<sup>1</sup> Juan-Carlos Reverter,<sup>2</sup> Dolors Colomer,<sup>3</sup> Neus Villamor,<sup>3</sup> Beatriz Bellosillo,<sup>4</sup> and Francisco Cervantes<sup>1\*</sup>

**Patients with essential thrombocythemia (ET) have an increased frequency of thrombosis, but the relationship of both thrombosis and *JAK2* V617F allele burden with platelet turnover, acquired activated protein C resistance (aAPCR), and levels of coagulation factors and soluble markers of platelet, and endothelial activation is not well known. In 53 ET patients (26 with a history of thrombosis), reticulated platelets (RP) percentage, aAPCR, platelet tissue factor (TF) expression, and plasma levels of TF, coagulation factors, soluble P-selectin (sP-selectin), soluble CD40 ligand (sCD40L), von Willebrand factor antigen (VWF:Ag), soluble thrombomodulin (sTM), D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 were compared with those in matched healthy individuals and correlated with thrombosis occurrence and *JAK2* mutational load. ET patients with thrombosis had significantly higher values for RP percentage, aAPCR, and levels of factors V and VIII, VWF:Ag, sP-selectin, and sCD40L than patients without thrombosis and controls. At multivariate study, RP percentage, factor V levels, and aAPCR were independently associated with an increased risk of thrombosis. Patients with *JAK2* mutation had significantly lower levels of free protein S (PS) and higher levels of TF, sP-selectin, sCD40L, VWF:Ag, and sTM than those with wild-type allele. A mutant allele dosage effect ( $\geq 12\%$ ) was observed for TF, sP-selectin, sCD40L, VWF:Ag, and PS levels. These results support a role for platelet turnover, factor V, and aAPCR in the thrombosis of ET as well as the association between *JAK2* V617F allele burden and either decreased free PS or increased TF and soluble markers of platelet and endothelial activation. *Am. J. Hematol.* 84:102–108, 2009. © 2008 Wiley-Liss, Inc.**

## Introduction

Essential thrombocythemia (ET) is a chronic myeloproliferative disorder associated in half of the patients with the mutation V617F of the Janus kinase 2 (*JAK2*) gene [1]. Thrombosis is a major cause of morbidity and mortality in ET patients [1], and there is increasing evidence that platelet and leukocyte activation plays an important role in the development of this complication [2–4]. On platelet activation, P-selectin and CD40 ligand are rapidly translocated to the platelet surface and subsequently cleaved to generate soluble forms fully active biologically, termed soluble P-selectin (sP-selectin) and soluble CD40 ligand (sCD40L) [5,6], both of which promote coagulation by inducing tissue factor (TF) expression on the monocytes and the endothelial cells [7]. Soluble CD40L also causes platelet activation and appears to be required for thrombus formation *in vivo* [6,8]. Although it has been reported that platelets contain functionally active TF, its exact role is not well known [9]. The contribution of sCD40L to acute coronary syndromes [10] and acute cerebral ischemia [11] has been demonstrated, but no study has been addressed at determining its relationship with the thrombosis of ET. Recent studies have found that presence of acquired activated protein C resistance (APCR) phenotype and elevated levels of coagulation factors are associated with increased risk of thrombosis [12]. Of note, an increased percentage of young or reticulated platelets (RP) has been reported in nine ET patients with thrombosis [13]. Presence of acquired APCR, elevated platelet turnover and levels of TF, hemostatic factors, sP-selectin and sCD40L may be directly involved in the pathophysiology of ET thrombotic complications. Therefore, these markers might be potentially useful to identify patients at greatest risk of thrombosis.

The aim of this study was to determine the relationship of platelet turnover, APCR, platelet-associated TF, circulating TF and coagulation factors or soluble markers of plate-

let, endothelial and coagulation activation with the thrombosis of ET patients and their *JAK2* V617F allele burden. For such purpose, the above laboratory parameters were studied in a group of ET patients with and without thrombosis or the *JAK2* mutation and in a group of matched controls.

## Results

### Clinicohematological data and *JAK2* V617F allele burden

The main clinicohematological data of patients and controls are summarized in Table I. Twenty-six patients had a positive history of major or minor occlusive vascular events, including erythromelalgia (eight patients), transient ischemic attack (seven patients), stroke (four patients), myocardial infarction (four patients), intermittent claudication (four patients), deep vein thrombosis (three patients), superficial thrombophlebitis (two patients), or Budd-Chiari syndrome (two patients). Me-

<sup>1</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Hemotherapy and Hemostasis Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Hematopathology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Pathology Department, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain

Conflict of interest: Nothing to report.

Contract grant sponsors: Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health; Contract grant number: RD06/0020/0004.

\*Correspondence to: Francisco Cervantes, Hematology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.  
E-mail: fcervan@clinic.ub.es

Received for publication 14 October 2008; Revised 12 November 2008; Accepted 13 November 2008

*Am. J. Hematol.* 84:102–108, 2009.

Published online 20 November 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.21338

**TABLE I. Main Clinical and Hematological Data of Controls and ET Patients at the Time of Study**

	Controls (n = 53)	ET without thrombosis (n = 27)	ET with thrombosis (n = 26)	P value
Age, years (range)	63.0 ± 15.0 (28–90)	63.3 ± 14.9 (28–91)	63.1 ± 15.2 (32–81)	0.973
Sex, M/F	27/26	14/13	13/13	0.846
Hemoglobin, g/L	134 ± 11	120 ± 16	119 ± 16	0.001
Leukocytes, × 10 <sup>9</sup> /L	6.3 ± 1.1	5.1 ± 2.2	4.7 ± 2.1	0.001
Platelets, × 10 <sup>9</sup> /L	242 ± 33	322 ± 111	270 ± 70	0.001

Values given as mean ± standard deviation; the P values refer to the comparisons between controls and ET patients with or without thrombosis; patients had lower hemoglobin and leukocyte counts because of the use of cytoreductive treatment.

**TABLE II. Clinical Features in 53 Patients with ET According to the JAK2 Mutation Status or Its Allele Burden**

	JAK2 mutation status			JAK2 V617F allele burden			P value
	Wild-type JAK2 (n = 31)	JAK2 V617F (n = 22)	P value	<12% (n = 4)	12–24% (n = 11)	≥ 25% (n = 7)	
Age, years	62 ± 16	65 ± 14	0.381	62 ± 16	66 ± 12	69 ± 15	0.753
Sex, M/F	14/17	13/9	0.406	3/1	7/4	3/4	0.528
Disease duration, months	89 ± 62	68 ± 43	0.177	57 ± 34	65 ± 43	79 ± 51	0.682
Splenomegaly (%)	3 (10)	1 (5)	0.629	0	0	1 (14)	0.325
Cytoreductive treatment (%)	17 (55)	15 (68)	0.218	3 (75)	8 (73)	4 (57)	0.747
Thrombosis (%)	14 (45)	12 (55)	0.501	1 (25)	7 (64)	4 (57)	0.408
Venous thrombosis (%)	3 (10)	3 (14)	0.778	0	2 (18)	1 (14)	0.735
Arterial thrombosis (%)	11 (36)	9 (41)	0.573	1 (25)	5 (46)	3 (43)	0.588
Thrombosis at diagnosis (%)	0	3 (14)	0.861	0	2 (18)	1 (14)	0.229
Thrombosis during follow-up (%)	13 (42)	7 (32)	0.134	1 (25)	3 (27)	3 (43)	0.220
Venous thrombosis (%)	3 (10)	1 (5)	0.165	0	0	1 (14)	0.523
Arterial thrombosis (%)	10 (32)	6 (27)	0.153	1 (25)	3 (27)	2 (29)	0.423
Major thrombosis (%)	10 (32)	10 (46)	0.329	1 (25)	6 (55)	3 (43)	0.712
Major bleeding (%)	2 (7)	3 (14)	0.579	0	3 (27)	0	0.085
Minor occlusive vascular events (%)	14 (45)	11 (50)	0.728	2 (50)	6 (55)	3 (43)	0.890

Values given as number of patients (percentages are given in parenthesis) and mean ± standard deviation; the P values refer to the comparisons between patients with and without JAK2 mutation or its allele burden (three subgroups having <12%, 12–24% and ≥ 25% JAK2 V617F mutant alleles).

dian interval between thrombosis and blood sampling was 64 months (range: 5 to 148), and no patient was studied during the acute phase of the thrombosis. At the time of study, ET patients received one or more of the following therapies: cytolytic drugs (hydroxyurea, n = 29; radioactive phosphorus, n = 10; anagrelide, n = 9), antiplatelet agents (aspirin, n = 13; ticlopidine, n = 5), and acenocoumarol (n = 7). There were no significant differences in the duration of the disease or in the treatment between patients with or without thrombosis (data not shown).

Detectable amounts of JAK2 V617F DNA in whole blood were found in 22 patients (41.5%), with the mean value of the allele percentage being 24.1% (range: 8.6–69.3%). Four patients had a JAK2 V617F allele burden <12%, 11 had 12–24% and 7 ≥ 25%. At diagnosis, ET patients with the JAK2 mutation showed higher Hb levels (142 ± 11 g/L vs. 131 ± 9 g/L, P = 0.001), leukocyte counts (10.2 ± 2.6 × 10<sup>9</sup>/L vs. 8.5 ± 2.4 × 10<sup>9</sup>/L, P = 0.03), and leukocyte alkaline phosphatase score (72.8 ± 27.4 vs. 38.1 ± 23.3, P = 0.001) than those without the mutation. A significant relationship was found between JAK2 V617F allele percentage and leukocyte counts (r = 0.467, P = 0.029). As summarized in Table II, there were no significant differences in age, sex, disease duration, splenomegaly rate, or thrombosis occurrence according to JAK2 mutation status or its allele burden. Thus, mean JAK2 V617F allele percentage was similar in patients with and without thrombosis (23.3 ± 9.3% vs. 24.9 ± 18.0%, P = 0.809), type of thrombosis (venous thrombosis, 24.2 ± 7.0% vs. arterial thrombosis, 23.1 ± 10.3%, P = 0.840), or timing of the event (at diagnosis, 28.7 ± 14.1% vs. during follow-up, 22.3 ± 8.4%, P = 0.521).

**Correlation of platelet turnover, platelet and circulating TF, coagulation factors, APCR, and soluble markers of platelet, endothelial and coagulation activation with the thrombosis**

\*\*\*Patients with a history of thrombosis had a significantly higher mean percentage of RP and circulating factor V, fac-

tor VIII, von Willebrand factor antigen (VWF:Ag), sP-selectin and sCD40L levels than those without thrombosis and the controls (P = 0.0001 for both comparisons, Table III). For these soluble markers of platelet activation, the differences persisted when the values were adjusted by platelet counts (Fig. 1A,B). Of note, a positive correlation between sCD40L and either sP-selectin (r = 0.448, P = 0.01) or factor V (r = 0.297, P = 0.032) was observed.

No significant difference was noted between patients and controls in platelet TF expression given in either percentage (ET without thrombosis, 0.23 ± 0.18%; ET with thrombosis, 0.29 ± 0.24%; controls, 0.34 ± 0.31%, P = 0.216) or molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) units (ET without thrombosis, 12.9 ± 6.0 MESF units × 10<sup>3</sup>; ET with thrombosis, 15.1 ± 8.7 MESF units × 10<sup>3</sup>; controls, 14.3 ± 7.2 MESF units × 10<sup>3</sup>, P = 0.538).

Patients showed lower free protein S (PS) levels than controls (ET without thrombosis, 87.1 ± 9.6 UI/dL; ET with thrombosis, 89.5 ± 10.1 UI/dL; controls, 95.3 ± 8.3 UI/dL, P = 0.001). No subject had the factor V Leiden mutation. Patients with previous thrombosis (2.01 ± 0.13) had a significantly lower mean activated protein C resistance (APC) sensitivity ratio than those without thrombosis (2.12 ± 0.08) and the controls (2.53 ± 0.21, P = 0.0001 for both comparisons). In ET patients, sP-selectin, factor VIII and VWF:Ag were inversely correlated with APC sensitivity ratio (r = -0.340, P = 0.01; r = -0.397, P = 0.01 and r = -0.338, P = 0.01, respectively). Acquired APCR (APC sensitivity ratio <2 in the absence of factor V Leiden) was more common in patients with thrombosis (8 of 26, 31%) than in those without (1 of 27, 4%, P = 0.01) or in the controls (0 of 53, 0%, P = 0.0001). Two patients with previous thrombosis and acquired APCR had also antiphospholipid antibodies.

There was a significant difference between patients and controls in prothrombin fragment 1 + 2 (F1 + 2) levels but not in TF, soluble thrombomodulin (sTM), D-dimer (Table III), antithrombin, protein C, and total PS concentrations



**TABLE III. Platelet Turnover, Plasma Levels of Tissue Factor, Coagulation Factors and Platelet, Endothelial and Coagulation Activation Markers in Healthy Controls and ET Patients with and Without Thrombosis**

	Controls (n = 53)	ET without thrombosis (n = 27)	ET with thrombosis (n = 26)	P value
Reticulated platelets, %	6.8 ± 4.4	14.1 ± 7.3	20.4 ± 6.7	0.0001*
Tissue factor, pg/mL	79.2 ± 26.6	76.3 ± 26.9	80.9 ± 29.1	0.823
Factor II, IU/dL	101.2 ± 19.5	97.4 ± 11.9	102.1 ± 12.5	0.518
Factor V, IU/dL	92.5 ± 22.1	107.9 ± 21.8	131.3 ± 21.5	0.0001*
Factor VII, IU/dL	118.2 ± 19.5	127.1 ± 31.1	125.3 ± 29.1	0.261
Factor VIII, IU/dL	107.0 ± 16.1	129.7 ± 27.3	155.5 ± 45.2	0.0001*
Factor IX, IU/dL	112.8 ± 27.0	108.7 ± 19.1	118.7 ± 23.1	0.325
Factor X, IU/dL	102.5 ± 15.3	103.7 ± 17.1	107.5 ± 15.8	0.442
Factor XI, IU/dL	108.3 ± 26.6	110.1 ± 19.3	118.3 ± 28.2	0.197
Factor XII, IU/dL	100.2 ± 28.9	93.6 ± 14.5	108.5 ± 24.3	0.097
Factor XIII, IU/dL	125.1 ± 25.6	136.6 ± 45.1	134.6 ± 49.1	0.356
sP-selectin, ng/mL	32.4 ± 11.9	70.6 ± 37.8	99.8 ± 47.1	0.0001*
sCD40L, pg/mL	81.3 ± 22.0	186.4 ± 92.0	226.7 ± 104.7	0.0001*
VWF:Ag, IU/dL	88.5 ± 20.2	101.4 ± 28.5	118.1 ± 34.9	0.0001*
sTM, ng/mL	25.1 ± 9.6	30.6 ± 23.2	31.1 ± 23.1	0.249
D-dimer, µg/L	86.0 ± 61.1	77.5 ± 50.9	71.7 ± 48.8	0.541
F1 + 2, nmol/L	0.76 ± 0.22	2.73 ± 2.4	2.35 ± 1.3	0.0001*

Values given as mean ± standard deviation; sP-selectin indicates soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand; VWF:Ag, von Willebrand factor antigen; sTM, soluble thrombomodulin; F1+2, prothrombin fragment 1+2; the P values refer to the comparisons between controls and ET patients with or without thrombosis.

\* significant difference among the three groups.

(data not shown). Moreover, a positive correlation was observed between plasma levels of sP-selectin and F1 + 2, an established marker of thrombin generation ( $r = 0.378$ ,  $P = 0.01$ ). In the multivariate analysis, patients with RP >16%, plasma concentration of factor V > 143 IU/dL, and acquired APCR had higher risk of thrombosis (Table IV). Finally, no influence of the treatment modality was noted in any of the laboratory parameters analyzed.

**Correlation of platelet turnover, TF, coagulation factors, APCR and soluble markers of platelet, endothelial and coagulation activation with the JAK2 mutational load**

Table V shows the laboratory parameters of ET patients according to JAK2 mutation status. As can be seen, mean TF, sP-selectin, sCD40L, VWF:Ag, and sTM concentrations were significantly higher in patients with the mutation, who had also significantly lower free PS levels ( $82.1 \pm 9.5$  UI/dL vs.  $92.7 \pm 7.5$  UI/dL,  $P = 0.001$ ). Similarly, patients with the mutation showed lower APC sensitivity ratios than patients without the mutation, but the difference was not significant ( $2.03 \pm 0.14$  vs.  $2.09 \pm 0.09$ ,  $P = 0.09$ ). No difference was observed between patients with or without the mutation in platelet TF expression (data not shown), acquired APCR rate (5 of 22 vs. 4 of 31,  $P = 0.464$ ), RP percentage or plasma concentrations of coagulation activation markers and coagulation factors (Table V) and inhibitors (data not shown).

As above mentioned, a significant increase in VWF:Ag was found in ET patients with the JAK2 mutation. Because plasma levels of VWF:Ag are lower in patients with the O blood group than in those with non-O groups [12], ABO typing was performed, with the frequency of group O being not significantly different in patients with and without the mutation (28.5% vs. 32.1%,  $P = 0.571$ ).

To identify a mutant allele dosage effect on the plasma markers of activation, patients were subdivided into four groups according to the percentage of JAK2 mutant alleles (0%, <12%, 12–24% and ≥25%). As can be seen in Fig. 2, plasma levels of sP-selectin, sCD40L, TF, VWF:Ag, and sTM increased or PS levels decreased in parallel with the

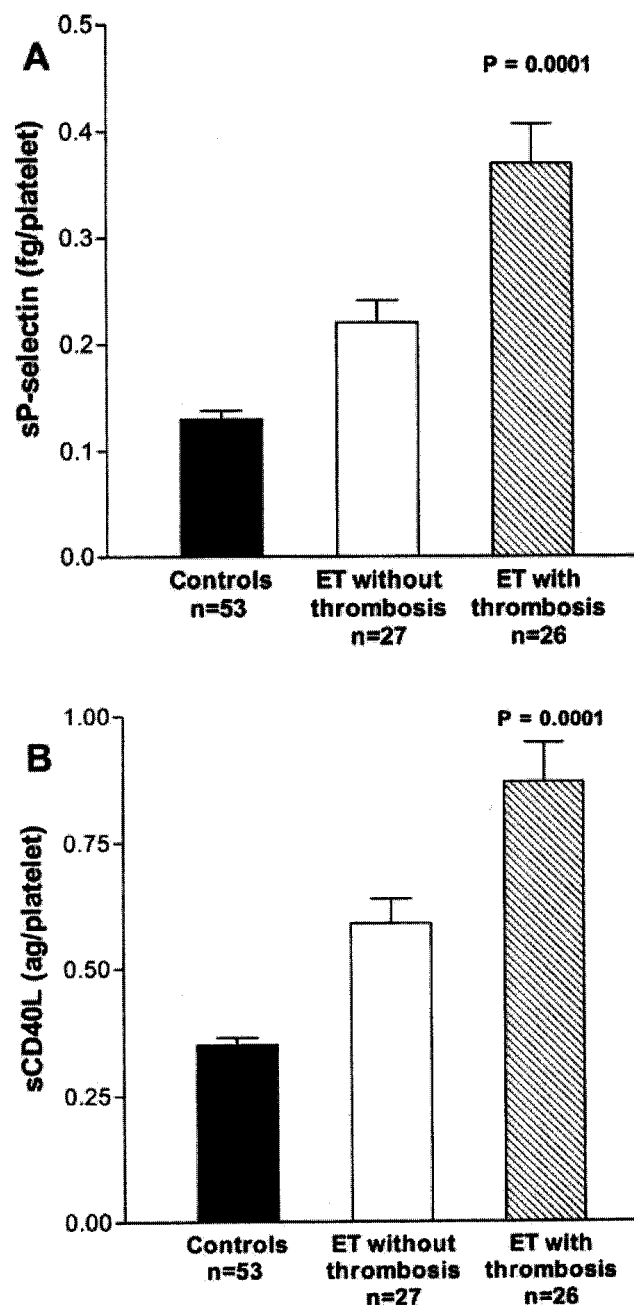


Figure 1. Concentration of soluble markers of platelet activation in matched healthy controls and ET patients without or with thrombosis. Plasma levels of sP-selectin (A) and sCD40L (B) expressed per platelet. Results expressed as mean and standard mean error. P value correspond to one-way ANOVA.

allele percentages, with the differences being statistically significant, except for sTM.

**Discussion**

In this study, the role in the thrombosis of ET of platelet turnover, platelet-associated TF, circulating TF, hemostatic factors, APCR, and soluble markers of platelet and endothelial activation was assessed, as well as their relationship with the patients' JAK2 mutation allele burden. This study shows that an excessive platelet turnover is a significant independent risk marker of thrombosis in ET patients, which is probably related to the autonomous thrombopoiesis of the disease and to the increased platelet consumption because of the platelet activation during the thrombogene-

**TABLE IV. Multivariate Analysis of the Prognostic Factors for the Appearance of Thrombosis in 53 Patients with ET**

	Odds ratio (95% CI)	P value
Acquired APCR	28.8 (1.3–622)	0.03
Factor V	11.4 (1.8–73.3)	0.01
Reticulated platelets	6.4 (1.1–37)	0.04
sP-selectin	5.6 (0.9–33.6)	0.06
sCD40L	3.1 (0.5–20.1)	0.2
VWF:Ag	2.8 (0.5–16.3)	0.2
Factor VIII	0.6 (0.2–3.5)	0.6
F1+2	0.2 (0.02–1.4)	0.1

APCR indicates activated protein C resistance (defined as an activated protein C sensitivity ratio < 2); sP-selectin, soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand; VWF:Ag, von Willebrand factor antigen; F1+2, prothrombin fragment 1+2.

sis. It must be pointed out that RP, when compared with mature platelets, have higher platelet volume and granular content and exhibit increased reactivity for aggregation,  $\alpha$  granule release, and surface P-selectin expression in response to different agonists [13–15].

In keeping with previous studies [16–18], increased sP-selectin and sCD40L levels were found in ET patients. An association between increased sP-selectin and thrombosis was previously reported by Musolino et al. [18] in a study of 24 ET patients. In this study, not only sP-selectin but also sCD40L were found to be significantly increased in ET patients with thrombosis. Indeed, the positive correlation between sP-selectin and F1 + 2 would suggest that sP-selectin overexpression might be a stimulus for clotting activation in ET. In this sense, high sP-selectin plasma levels have been shown to induce a procoagulant state in mice [19]. Thus, sP-selectin might be involved in phosphatidylserine exposure in the monocytes and in the genesis of leukocyte-derived microparticles containing active TF, which enhance thrombin generation and fibrin deposition through a P-selectin glycoprotein ligand-1 dependent mechanism [9,20]. In addition, sCD40L induces platelet P-selectin expression, aggregation, leukocyte activation, platelet-leukocyte conjugation, and platelet release of reactive oxygen intermediates [6,8,21,22]. Our findings suggest that sP-selectin and sCD40L, which are released from the activated platelets, could play a role in the pathogenesis of ET thrombosis. Of note, we have recently reported that platelet P-selectin expression is significantly higher in ET patients with a history of thrombosis than in those without [4].

It has been previously shown that TF is the principal activator of the coagulation *in vivo* and that it circulates in the blood associated with monocyte-derived membrane microparticles and as a soluble alternatively spliced form [9]. In spite of the recently described increase in monocyte and neutrophil TF expression in ET [4,23], no increase in platelet TF expression and TF plasma concentration was found in this study and similar results have been reported in polycythemia vera (PV) [24]. In contrast, Falanga et al. [25] showed a higher platelet TF expression in ET patients when compared with controls not age- and sex-matched. On turn, elevated plasma levels of VWF:Ag, a large glycoprotein mainly synthesized by the endothelial cells that plays an important role in platelet thrombus formation [9], were observed in ET patients, especially in those with previous thrombosis. Increased levels of factor V were associated with higher risk of thrombosis at multivariate analysis, a finding that was reported in ET for the first time by our group. Presumably, increased levels of these factors result in the acceleration of clotting, leading to enhanced risk of thrombus formation. The higher thrombin generation values observed by Marchetti et al. [26] in ET and PV patients with previous thrombosis are in agreement with this finding.

**TABLE V. Platelet Turnover, Plasma Levels of Tissue Factor, Coagulation Factors and Platelet, Endothelial and Coagulation Activation Protein Markers in ET Patients According to JAK2 Mutation**

	Wild-type JAK2 (n = 31)	JAK2 V617F (n = 22)	P value
Reticulated platelets, %	17.1 ± 8.1	17.3 ± 7.1	0.938
Tissue factor, pg/mL	67.6 ± 16.1	88.1 ± 32.6	0.023
Factor II, IU/dL	101.8 ± 14.6	99.4 ± 13.5	0.576
Factor V, IU/dL	118.9 ± 23.6	120.0 ± 26.2	0.871
Factor VII, IU/dL	124.2 ± 31.4	129.3 ± 27.9	0.566
Factor VIII, IU/dL	137.1 ± 41.2	149.8 ± 35.2	0.232
Factor IX, IU/dL	114.5 ± 21.8	112.1 ± 21.3	0.699
Factor X, IU/dL	104.9 ± 14.9	106.7 ± 19.0	0.720
Factor XI, IU/dL	117.2 ± 26.6	109.6 ± 19.4	0.257
Factor XII, IU/dL	95.5 ± 20.5	97.9 ± 20.1	0.677
Factor XIII, IU/dL	135.5 ± 53.5	135.7 ± 36.2	0.988
sP-selectin, ng/mL	67.9 ± 36.2	104.3 ± 45.3	0.004
sCD40L, pg/mL	173.2 ± 74.6	248.2 ± 115.4	0.007
VWF:Ag, IU/dL	99.9 ± 30.5	121.1 ± 32.3	0.019
sTM, ng/mL	24.2 ± 5.7	40.3 ± 33.2	0.026
D-dimer, $\mu$ g/L	76.8 ± 52.9	70.2 ± 43.4	0.226
F1+2, nmol/L	2.36 ± 1.7	2.80 ± 2.2	0.362

Values given as mean ± standard deviation; sP-selectin indicates soluble P-selectin; sCD40L, soluble CD40 ligand; VWF:Ag, von Willebrand factor antigen; sTM, soluble thrombomodulin; F1+2, prothrombin fragment 1+2; the p values refer to the comparisons between ET patients with and without JAK2 mutation.

In this study, a high prevalence of acquired APCR and its independent association with an increased risk of thrombotic events in patients with ET was observed, which suggest that a reduced sensitivity for APC may represent an important mechanism of thrombosis in these patients. Previously, Bucalossi et al. [27] detected APCR in 3 of 20 ET and PV patients with thrombosis when compared with none of 11 patients without thrombosis. Our results are also in line with the frequent finding of acquired APCR in ET and other hematological malignancies using a thrombin generation assay [26,28]. Confirming previous observations, we found decreased levels of free PS [26–29] and its inverse relationship not only with mutational status [26] but also with allele percentage. The mechanisms causing acquired APCR are not clear, although it has been suggested to be related to antiphospholipid antibodies, reduced PS levels and high levels of factors V, VIII and VWF:Ag, as it was observed in the present ET series [26,28,30]. However, whether our data could identify ET patients at higher thrombotic risk remains to be confirmed by larger prospective clinical studies.

Our study also shows that ET patients with the JAK2 mutation have enhanced plasma concentrations of both TF and soluble markers of platelet and endothelial activation. The relationship between JAK2 mutation status and these activation markers was further analyzed according to the proportion of mutant alleles. A JAK2 mutant allele dosage effect could be demonstrated on sP-selectin, sCD40L, TF, and VWF:Ag levels, with the highest plasma levels being found in patients with more than 12% JAK2 V617F mutant alleles. These findings are consistent with the increase in platelet P-selectin expression recently reported by us in ET patients with the JAK2 mutation [4], supporting a role for the mutation in the ET platelet activation. In keeping with these findings, an increase in circulating sP-selectin has also been observed in patients with JAK2-positive myeloproliferative disorders [31]. The increase of the signals mediated by both platelet-derived sP-selectin and sCD40L would increase the TF synthesis by the endothelial cells or the monocytes [7].

Presence of the JAK2 mutation has also been associated with higher sTM levels in ET [25]. However, although in this study, a certain JAK2 V617F allele dosage effect on sTM levels was observed, it did not reach statistical significance.

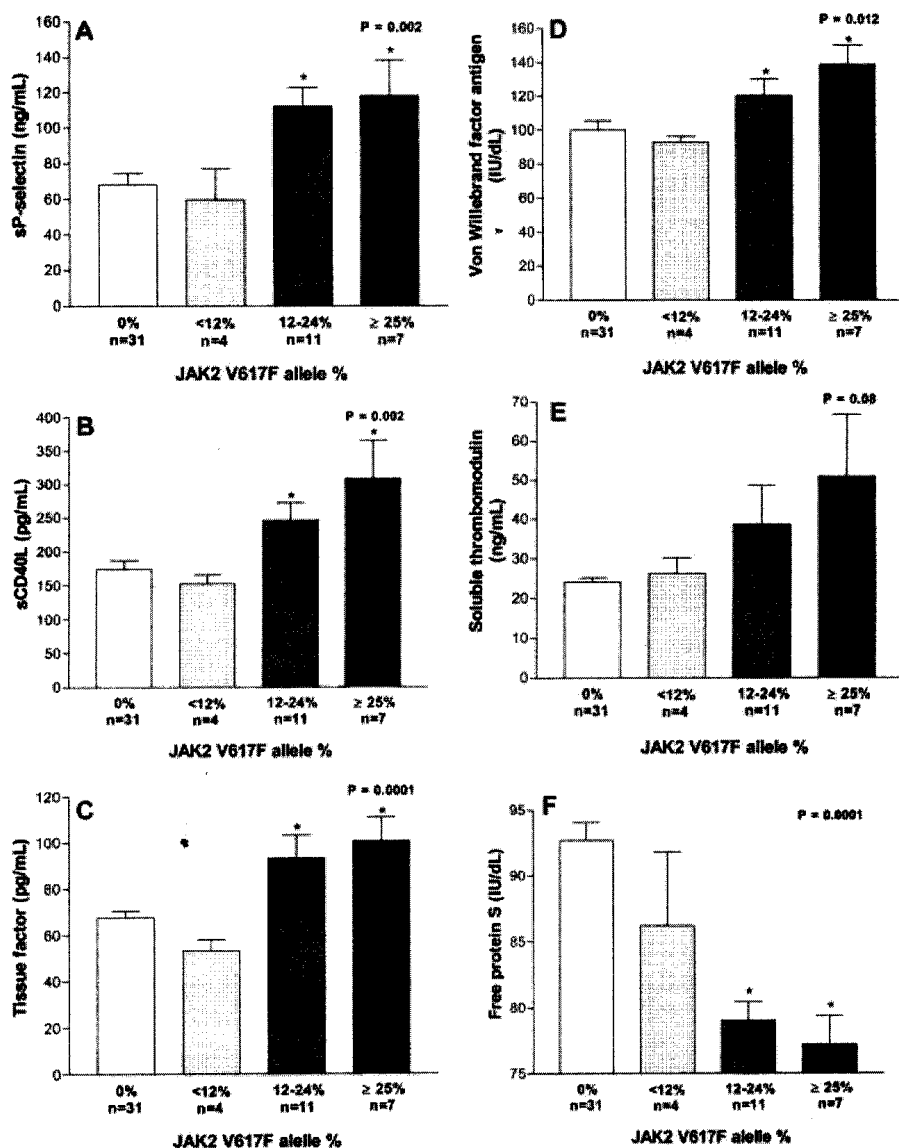


Figure 2. Plasma levels of sP-selectin (A), sCD40L (B), tissue factor (C), von Willebrand factor antigen (D), soluble thrombomodulin (E) and free protein S (F) in ET patients according to the JAK2 V617F allele percentage. Total of 53 patients were divided into four subgroups having 0%, <12%, 12–24% and ≥ 25% JAK2 V617F mutant alleles, respectively. Results are expressed as mean and standard mean error. P value corresponds to one-way ANOVA. Posthoc analysis using the Student-Newman-Keuls test paired comparisons: \*P < 0.05 with respect to patients without the mutation or less than 12% JAK2 V617F mutant alleles.

Because sTM is an early marker of initial endothelial cell membrane damage [28,32], it is possible that the JAK2 mutation promotes leukocytosis and higher platelet and leukocyte activation, probably causing endothelial activation or damage by engagement of the soluble adhesion receptors and release of proteases, cytokines, or reactive oxygen species [1,2,4,21–23,32–34]. Defective endothelial cells that could derive from the JAK2 mutated hematopoietic stem cells or sTM synthesized by the megakaryocytes, platelets, and neutrophils would be an alternative explanation [35–37].

The above data suggest that, in ET, the JAK2 mutation would promote an enhanced prethrombotic state. In this regard, the higher rate of overall thrombosis or venous thrombosis in ET patients with the JAK2 mutation found in some studies is noteworthy, although such association was not confirmed in ours and other studies [1,38,39]. Besides, an increased percentage of JAK2 allele burden was found in ET patients with venous or arterial thrombosis by Kittur et al.

[40], Antonioli et al. [41], and Carobbio et al. [42], whereas no significant differences were observed in this nor in other study [43], probably due to the lower number of patients.

In conclusion, the presence of acquired APCR phenotype, elevated platelet turnover, and factor V are related with an increased risk of thrombosis in ET patients. The load of JAK2 mutant alleles in ET is associated with lower PS levels and higher plasma levels of TF and soluble markers of platelet and endothelial activation.

### Patients and Methods

**Patients and diagnostic criteria.** This study was performed in conjunction with a previously published flow cytometry study that examined platelet and leukocyte activation status in ET [4]. The subjects of both studies were 53 patients diagnosed with ET according to the criteria of the polycythemia vera study group [44]. Thrombosis was defined by a history of major or minor occlusive vascular events as previously described [4]. Fifty three age- and sex-matched healthy individuals served as controls. The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained.

**Samples and reagents.** Blood was obtained from an antecubital vein through a 21-gauge butterfly needle with a light tourniquet. After the first 2 mL of blood was discarded, 4.5 mL of blood was collected into a citrate-containing tube (0.129 M, 3.8%, Vacutainer system, Becton Dickinson, San Jose, CA). For coagulation factors, APCR, and soluble markers, the sample was centrifuged at 4,500 rpm for 15 min, and aliquots of the plasma were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. For flow cytometry, PE-Cy5 mouse anti-CD42b directed against the platelet glycoprotein Ib was used for platelet identification and platelet TF expression determined by PE-conjugated anti-CD142 monoclonal antibody (Becton Dickinson). Irrelevant subclass-matched monoclonal antibodies served as negative controls.

**RP and platelet TF determination by flow cytometry.** RP are young platelets that have been recently released into the circulation, contain a residual amount of megakaryocyte derived mRNA and its measurement is useful for evaluating platelet kinetics as marker of platelet production and turnover [13]. The study was started within 10 min after sample collection. Circulating RP and platelet TF expression were measured by flow cytometry using a previously described whole blood method [4]. For this purpose, thiazole orange at a final concentration of 0.1 mL/mL (Retic-Count, Becton Dickinson) and anti-CD42b-PE-Cy5 were used. For the platelet TF assay, 5- $\mu\text{L}$  of whole blood was aliquoted in a polypropylene tube containing 50  $\mu\text{L}$  of phosphate buffered saline (PBS) solution, anti-CD42b-PE-Cy5, and anti-CD142-PE. After 15 min of incubation at room temperature, samples were resuspended in 1 mL of PBS before analysis. Flow cytometry data were collected on a FACScan (BDIS, San Jose, CA). Single platelet population was identified in whole blood by their characteristic side scatter and CD42b positivity, and 10,000 events were collected from each sample. The platelet fluorescence of thiazole orange was expressed as the percentage of platelets showing fluorescence positivity in more than 99% of platelets incubated with the correspondent unstained isotype control. Platelet membrane TF expression was measured in arbitrary units of mean fluorescence intensity (MFI) and as the percentage of platelets positive compared with a negative control. Platelet TF expression was quantified by converting MFI values into MESF units using standardized fluorescent beads (Quantum<sup>®</sup> PE Medium Level, BangsLabs).

**TF, coagulation factors, and APCR.** Plasma TF levels were determined using a commercially available kit according to the manufacturer's protocol (American Diagnostica, Stamford) and the results expressed in pg/mL. Coagulation factors II, V, VII, IX, X, XI, and XII were measured by one-stage clotting assays using factor deficient plasmas (Dade Behring, Marburg, Germany). Coagulation factors VIII and XIII were determined using chromogenic and photometric assay, respectively (Chromogenix, Mölndal, Sweden and Berichrom FXIII, Dade Behring). Antithrombin, protein C activity, and total and free PS measurements were determined using commercial kits (Dade Behring, Chromogenix and Stago, Asnières, France, respectively). The results were expressed in IU/dL. Screening for lupus anticoagulant and anti-cardiolipin antibodies was carried out as described [30]. APCR was determined in plasma measuring the prolongation of activated partial thromboplastin time (aPTT) in response to the addition of APC after sample dilution with factor V deficient plasma [30] (Chromogenix). Results were expressed as APC sensitivity ratio between aPTT with and without APC. Factor V Leiden mutation was assessed by a nucleic acid sequence-based amplification assay (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Patients with an APC sensitivity ratio lower than 2, in the absence of factor V Leiden, were considered to have acquired APCR.

**Soluble markers of platelet activation.** As soluble markers of platelet activation, plasma levels of sP-selectin and sCD40L were measured by enzyme-linked immunosorbent assays (R&D Systems, Abingdon, UK). Results were expressed in ng/mL for sP-selectin and in pg/mL for sCD40L. Additionally, because of the tight correlation between platelet count and either plasma sP-selectin or sCD40L [17,18] levels of sP-selectin and sCD40L per platelet were calculated by dividing the concentration of these soluble markers by the individual platelet count.

**Soluble markers of endothelial activation.** The plasma levels of VWF:Ag and sTM were determined as markers of endothelial activation or damage by enzyme-linked immunosorbent assays (Corgenix, Westminster and American Diagnostica, Stamford). The results were expressed in IU/dL for VWF:Ag and in ng/mL for sTM.

**Soluble markers of coagulation and fibrinolysis activation.** Plasma levels of F1 + 2 and D-dimer were measured as markers of coagulation and fibrinolysis activation using commercially available kits

(Enzignost F1 + 2 and D-dimer Plus, Dade Behring) and the results were given in nmol/L for F1 + 2 and in  $\mu\text{g/L}$  for the D-dimer.

#### Real time quantitative PCR assay for JAK2 V617F mutation.

Genomic DNA was extracted from blood samples using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany). The presence of the JAK2 V617F mutation was analyzed in duplicate by real-time allele-specific polymerase-chain-reaction with probes specific for the mutated and the wild-type form as previously described [45]. A ratio between the Ct (JAK2 V617F) and Ct (JAK2 wild-type) was calculated for each sample. To correlate this ratio with the percentage of JAK2 V617F allelic burden, a standard curve was obtained by diluting granulocytes from homozygous PV patients in normal cells.

**Statistical methods.** The SPSS 12.0 statistical package (SPSS, Chicago) was used. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Chi-square test was used to compare categorical variables and the Mann-Whitney U test to compare continuous variables between the groups. Differences between groups were analyzed with one-way ANOVA followed by post-hoc analysis using the Student-Newman-Keuls test. The effect of the different variables on thrombosis was adjusted through multivariate logistic regression. The cut-off for each variable was settled at the median value. The adjusted odds ratio for each binary variable was obtained by exponentiating the  $\beta$  coefficient of that variable. All independent variables were forced to stay in the logistic model. All reported p values are two-sided. Statistical significance was considered at p values  $< 0.05$ .

## Acknowledgments

Eduardo Arellano-Rodrigo is a recipient of an Emili Letang post-Fellowship Research Award from the Hospital Clínic. The authors sincerely thank Montserrat Corbella for her excellent technical assistance.

## References

- Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22:905–914.
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000;96:4261–4266.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005;33:523–530.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, et al. 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.
- Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-selectin and platelet clearance. *Blood* 1998;92:4446–4452.
- Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, et al. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003;92:1041–1048.
- Lindmark E, Tenno T, Seigbahn A. Role of P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2322–2328.
- Prasad KSS, Andre P, He M, et al. Soluble CD40 ligand induces  $\beta 3$  integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12367–12371.
- Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938–949.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104–1111.
- Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, et al. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003;34:1412–1418.
- Lowe GDO. Can haematological tests predict cardiovascular risk? The 2005 Kettle lecture. *Br J Haematol* 2006;133:232–250.
- Rinder HM, Schuster JE, Rinder CS, et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood* 1998;91:1288–1294.
- Rinder HM, Tracey JB, Recht M, et al. Differences in platelet  $\alpha$ -granule release between normals and immune thrombocytopenic patients and between young and old platelets. *Thromb Haemost* 1998;80:457–462.
- Balduini CL, Noris P, Spedini P, et al. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999;106:202–207.
- Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, et al. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 1997;77:181–185.
- Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B, et al. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002;99:2612–2614.

18. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, et al. Markers of endothelial and platelet status in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Hematology* 2000;4:397-402.
19. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, et al. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13835-13840.
20. del Conde I, Nabi F, Tonda R, et al. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1065-1070.
21. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, et al. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2428-2434.
22. Khan SY, Keiher MR, Heal JM, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2006;108:2455-2462.
23. Maugeri N, Giordano G, Petrilli MP, et al. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: A new effect for an old drug? *J Thromb Haemost* 2006;3:245-250.
24. Kornberg A, Rahimi-Levene N, Yona R, et al. Enhanced generation of monocyte tissue factor and increased plasma prothrombin fragment 1+2 levels in patients with polycythemia vera: Mechanism of activation of blood coagulation. *Am J Hematol* 1997;56:5-11.
25. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: Relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007;35:702-711.
26. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2008;112:4061-4068; Prepublished on September 3, 2008, as DOI 10.1182/blood-2008-06-164087.
27. Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, et al. Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. *Am J Hematol* 1996;52:14-20.
28. Negaard HFS, Iversen PO, Østenstad B, et al. Increased acquired activated protein C resistance in unselected patients with hematological malignancies. *J Thromb Haemost* 2008;6:1482-1487.
29. Jensen MK, de Nully Brown P, Thorsen S, Hasselbalch HC. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2002;69:185-191.
30. Muñoz-Rodríguez FJ, Reverter JC, Font J, et al. Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002;11:730-735.
31. Robertson B, Urquhart C, Ford I, et al. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: Relationships with JAK2 V617F status, clonality and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007;5:1679-1685.
32. Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 2002;107:340-349.
33. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;107:3676-3682.
34. Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, et al. Increased platelet, leukocyte and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann Hematol* 2008;87:269-276.
35. Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood* 1992;80:1254-1263.
36. Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6224-6229.
37. Sozer S, Wang X, Zhang W, et al. Circulating angiogenic monocyte progenitor cells are reduced in JAK2V617F high allele burden myeloproliferative disorders. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:284-291; Prepublished on August 19, 2008, as DOI 10.1016/j.bcmd.2008.06.008.
38. Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: Measuring the uncertain. *Haematologica* 2008;93:1412-1414.
39. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, et al. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112:3135-3137.
40. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, et al. Clinical correlates of JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279-2284.
41. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93:41-48.
42. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008;26:2732-2736.
43. Pemmaraju N, Moliterno AR, Williams DM, et al. The quantitative JAK2 V617F neutrophil allele burden does not correlate with thrombotic risk in essential thrombocytosis. *Leukemia* 2007;21:2210-2212.
44. 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, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29-39.
45. Levine RL, Bellsle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107:4139-4141.



## **V. DISCUSIÓN**





### **5.1. Aumento de la activación plaquetaria y leucocitaria como mecanismo contribuyente a la trombosis en la trombocitemia esencial y su correlación con el estado mutacional del gen *JAK2***

Las complicaciones trombóticas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la TE (Passamonti *et al*, 2004). Si bien las trombosis arteriales son las más frecuentes, las venosas también son habituales (Passamonti *et al*, 2004; Elliott y Tefferi, 2005; Campbell *et al*, 2005). Aunque los mecanismos implicados en la patogenia de la trombosis no son bien conocidos, es probable que la propia trombocitosis y las alteraciones en el funcionalismo plaquetario y leucocitario puedan ser factores involucrados (Schafer, 1984; Finazzi *et al*, 1996; Wehmeier *et al*, 1997; Falanga *et al*, 2000, 2005 y 2005a; Jensen *et al*, 2000). Sin embargo, no se han realizado estudios dirigidos específicamente a averiguar si existen diferencias en los parámetros de activación plaquetaria y leucocitaria entre los pacientes con y sin antecedente de trombosis.

La P-selectina es una proteína que se expresa de forma constitutiva en la membrana interna de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y se trasloca rápidamente a la superficie tras la activación (Andre *et al*, 2000, Andre, 2004). Dicha proteína interviene en la agregación plaquetaria y en la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico, así como en la génesis de micropartículas leucocitarias ricas en factor tisular que sustentan la producción de fibrina (Merten *et al*, 2000; Merten y Thiagarajan, 2000; Andre, 2004; Maugeri *et al*, 2006; Furie y Furie, 2004 y 2008). En el presente estudio se ha observado que las plaquetas de los pacientes con TE y trombosis previa tienen un aumento de la expresión de P-selectina basal y tras estímulo con ácido araquidónico en

comparación con los pacientes con TE sin trombosis y los donantes sanos. Este hallazgo está relacionado con los resultados de un estudio reciente de pacientes con NMP y trombosis arterial (Karakantza *et al*, 2004) y apoya el papel de la activación plaquetaria en la génesis de la trombosis en la TE. Ello podría explicarse por la evidencia clínica y experimental del aumento de la actividad de la ciclooxigenasa plaquetaria y el incremento de la producción de tromboxano A2 (Schafer, 1982; Michiels *et al*, 1985; Mayordomo *et al*, 1995; Rocca *et al*, 1995; Finazzi *et al*, 1996; van Genderen *et al*, 1995 y 1999).

Tras el estímulo con trombina las plaquetas de los pacientes con TE presentaban una expresión de P-selectina significativamente mayor que los controles. En este sentido, Jensen *et al* (2000) encontraron una disminución de la expresión de P-selectina en unidades MESF tras estímulo con ADP o el péptido activador del receptor de la trombina (TRAP) en pacientes con TE y PV, una disparidad que se podría explicar por la selección de pacientes o la técnica de citometría de flujo utilizada. Así mismo, en el presente estudio, los pacientes con TE presentaban un porcentaje de complejos plaqueta-neutrófilo y plaqueta-monocito significativamente superior al de los controles. Así, encontramos una correlación positiva entre el porcentaje de P-selectina, recuento plaquetario y complejos leucocito-plaqueta, en concordancia con otros resultados en pacientes con NMP (Carulli *et al*, 1995; Kaplar *et al*, 2000; Jensen *et al*, 2001; Villmow *et al*, 2003; Alvarez-Larrán *et al*, 2004 y 2008; Falanga *et al*, 2005). Es bien conocido que el incremento de la interacción leucocito-plaqueta facilita la activación y adhesión leucocitaria, así como la transferencia de factor tisular entre monocitos y plaquetas (Østerud, 1998; McEver, 2001; Mackman, 2004; Dale *et al*, 2008).

La integrina CD11b es la subunidad  $\alpha_M$  del complejo CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1), cuya función fundamental es la adhesión firme de los leucocitos al endotelio y a las plaquetas (Yakubenko *et al*, 2002; Bouchard y Tracy, 2003; Dale *et al*, 2008). Tras la activación, los leucocitos aumentan la expresión del CD11b de membrana facilitando su adhesión al endotelio, la fagocitosis, agregación homo o heterotípica, la producción de radicales de oxígeno y la desgranulación (McEver, 2001; Yakubenko *et al*, 2002; Bouchard y Tracy, 2003; Dale *et al*, 2008). Además, los granulocitos, especialmente los monocitos están implicados en el proceso de deposición de fibrina mediante la activación de la coagulación a través de la expresión de factor tisular y la liberación de proteasas o radicales libres (Bouchard y Tracy, 2003; Marchetti y Falanga, 2008). En el presente estudio hemos observado un incremento de la expresión de CD11b en el neutrófilo y monocito de pacientes con TE con respecto a los donantes sanos. Además, la expresión de CD11b monocitario era significativamente más alta a aquellos pacientes con trombosis previa. A este respecto, nuestro grupo ha demostrado la posible implicación del aumento de expresión del CD11b en el neutrófilo en el desarrollo de síndrome de Budd-Chiari o trombosis del eje esplenoportal en pacientes con PV (Alvarez-Larrán *et al*, 2004). Es posible que el incremento de la activación leucocitaria y plaquetaria contribuya a la lesión del endotelio y/o a la progresión de las reacciones de coagulación mediante las moléculas de adhesión o liberación de proteasas. En cuanto a los datos sobre la expresión del factor tisular del monocito (FTm) en la TE, son escasos (Bazzan *et al*, 1996).

En nuestro estudio, los pacientes con TE tenían un aumento de la expresión de FTm en comparación a los controles sanos, siendo superior el

porcentaje de monocitos que expresaban factor tisular tras estímulo con lipopolisacárido (LPS) en aquellos con trombosis previa. Dado que el monocito es una célula clave en el modelo actual de la coagulación, nuestros resultados sugieren que el aumento del FTm podría ser importante en la patogénesis de la trombosis en la TE. Se podría hipotetizar que la sobreexpresión del CD11b es debida a la proliferación clonal de la TE. En este sentido, el aumento de la expresión del FTm podría reflejar el propio incremento de la activación monocitaria y/o ser debido a la interacción monocito-plaqueta (Reverter *et al*, 1996; Østerud, 1998; Andre *et al*, 2000; Andre, 2004; Furie y Furie, 2004 y 2008).

La frecuencia de la mutación V617F de *JAK2* en nuestros pacientes es similar a la encontrada por otros autores (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005). La ausencia de asociación entre esta mutación y la incidencia de eventos trombóticos también está de acuerdo con dos estudios recientes de pacientes con TE (Antonioli *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005). Nosotros observamos una asociación significativa entre la presencia de la mutación V617F y un aumento de la expresión de P-selectina basal y tras estímulo con trombina o ácido araquidónico. Esta observación sugiere que la expresión de P-selectina está mediada por *JAK2* y es consistente con la presencia de *JAK2* en plaquetas y su subsiguiente fosforilación después del estímulo con trombina (Rodríguez-Liñares y Watson, 1994). La actual evidencia del papel de la trombopoyetina en la activación plaquetaria y su capacidad de mejorar la respuesta después del estímulo con agonistas por medio de la vía de *JAK2* podría explicar en parte nuestros hallazgos (Bellucci y Michiels, 2000; Tibles *et al*, 2001). Así mismo, los

pacientes afectados de TE con la mutación de *JAK2* mostraron un aumento de la expresión del CD11b del neutrófilo y FTm en unidades MESF tras estímulo con LPS, lo cual es consistente con la participación de *JAK2* en la activación leucocitaria mediada por LPS (Okugawa *et al*, 2003). En un estudio aparecido después de la publicación de la presente investigación (Arellano-Rodrigo *et al*, 2006), se estudió la relación existente entre diferentes parámetros de activación leucocitaria y plaquetaria y la presencia de la mutación V617F de *JAK2* en 75 pacientes afectados de TE, observándose que los pacientes con la mutación presentaban un incremento de la fosfatasa alcalina granulocitaria y CD14 en los neutrófilos y un mayor porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta circulantes (Falanga *et al*, 2007).

Aunque en nuestro estudio no observamos diferencias en los parámetros analizados dependiendo del tipo de tratamiento realizado, un ensayo clínico ha demostrado una disminución de la incidencia de eventos trombóticos en pacientes tratados con hidroxiurea más ácido acetilsalicílico en comparación con anagrelida más ácido acetilsalicílico, lo que sugiere que el efecto panmielosupresor de la hidroxiurea es más eficaz y podría guardar relación con la implicación de los leucocitos en la patogenia de la trombosis (Harrison *et al*, 2005b), tal como se describe en la presente investigación. Si el aumento de P-selectina, CD11b o FTm pudiera identificar a aquellos pacientes con TE con un mayor riesgo de trombosis requiere la realización de estudios prospectivos.

En conclusión, los pacientes afectados de TE con trombosis previa muestran un marcado aumento en la activación plaquetaria y monocitaria, mientras que la presencia de la mutación de *JAK2* se asocia con un incremento en la activación plaquetaria en estos pacientes. Estas alteraciones pueden

tener un papel en la patogenia de la trombosis en la TE, pero se requieren nuevos estudios para valorar si estos hallazgos pueden identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo trombótico.

## **5.2. Renovación plaquetaria, factores de coagulación y marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial en la trombocitemia esencial: relación con la presencia de trombosis y la carga alélica V617F de JAK2**

La trombosis constituye la principal complicación en los pacientes con TE (Passamonti *et al*, 2004; Elliott y Tefferi, 2005; Campbell *et al*, 2005). A partir de los resultados de diferentes trabajos publicados en los últimos años, se ha sugerido que la activación de los leucocitos y de las plaquetas, así como las interacciones entre ambos desempeñan un papel importante en la patogenia de la trombosis de los pacientes con TE (Falanga *et al*, 2000, 2005 y 2005a; Jensen *et al*, 2000 y 2001; Arellano-Rodrigo *et al*, 2006). Durante la activación plaquetaria, la P-selectina y CD40 ligando son rápidamente translocados a la superficie plaquetaria y subsiguientemente son clivados para generar formas solubles biológicamente activas, denominadas P-selectina soluble (sP-selectina) y CD40 ligando soluble (sCD40L) (Berger *et al*, 1998; Henn *et al*, 2001; Inwald *et al*, 2003), las cuales estimulan la coagulación mediante la expresión de factor tisular (FT) en los monocitos y células endoteliales (Lindmark *et al*, 2000). Aunque se sabe que las plaquetas expresan FT, su papel exacto no se conoce bien (Siddiqui *et al*, 2002; Camera *et al*, 2003; Panes *et al*, 2007; Furie y Furie, 2008). La implicación del sCD40L en los síndromes coronarios agudos y accidentes cerebrovasculares se ha descrito recientemente (Heeschen *et al*, 2003; Garlich *et al*, 2003), pero su relación con la trombosis en la TE no se ha estudiado. Estudios recientes han observado que la presencia de la resistencia adquirida a la proteína C activada

(RAPCA) y la elevación de los factores de coagulación o del porcentaje de plaquetas reticuladas (PR) están asociados a un incremento del riesgo trombótico (Rinder *et al*, 1998; de Visser *et al*, 1999; Lowe, 2006). La presencia de RAPCA y el aumento de la renovación plaquetaria y los niveles plasmáticos de los factores de coagulación, sP-selectina y sCD40L pueden estar implicados en la fisiopatología de la trombosis en la TE y ser útiles para identificar a pacientes con un mayor riesgo trombótico.

En este estudio (Arellano-Rodrigo *et al*, 2009) se ha evaluado el posible papel de la renovación plaquetaria, del factor tisular circulante o expresado en la plaqueta, de la RAPCA, de los factores de coagulación y de ciertos marcadores solubles de activación plaquetaria o endotelial en la trombosis de los pacientes con TE, así como su relación con la carga alélica de la mutación de *JAK2*. Nuestro estudio ha demostrado que un aumento de la renovación plaquetaria medida por el porcentaje de plaquetas reticuladas es un marcador independiente de riesgo trombótico en pacientes con TE, lo que probablemente se relaciona con la propia trombocitopoyesis autónoma de la enfermedad y con el consumo plaquetario por activación plaquetaria durante la trombogénesis. A este respecto, las PR cuando se comparan con plaquetas maduras, tienen un volumen y contenido granular superior y exhiben un aumento de la reactividad para la agregación, liberación de gránulos  $\alpha$  y expresión de P-selectina en respuesta a diferentes agonistas (Rinder *et al*, 1998 y 1998a; Tàssies *et al*, 1998; Balduini *et al*, 1999; Guthikonda *et al*, 2008).

En concordancia con estudios previos, hemos observado un aumento de las concentraciones de sP-selectina y sCD40L en pacientes con TE (Fijnheer *et al*, 1997; Musolino *et al*, 2000; Viallard *et al*, 2002). La asociación entre el



aumento de sP-selectina y trombosis había sido previamente descrito por Musolino *et al* (2000) en un estudio de 24 pacientes con TE. En nuestro estudio, además de la sP-selectina, también observamos unos valores elevados de sCD40L en pacientes con trombosis previa. Además, la presencia de una correlación positiva entre la sP-selectina y el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) sugiere que la sP-selectina podría ser un estímulo para la activación de la coagulación en estos enfermos. En este sentido, una concentración elevada de sP-selectina en plasma induce un estado procoagulante en el ratón (Andre *et al*, 2000). Así, la sP-selectina está involucrada en la exposición de fosfatidilserina en monocitos y en la génesis de micropartículas derivadas de los leucocitos que contienen FT, las cuales incrementan la generación de trombina y el depósito de fibrina mediante un mecanismo dependiente de la glucoproteína ligando de la P-selectina (del Conde *et al*, 2005; Furie y Furie, 2008). Además, el sCD40L induce la expresión de P-selectina plaquetaria, agregación, activación leucocitaria, conjugación plaqueta-leucocito liberación plaquetaria de radicales libres de oxígeno y participa en la formación del trombo *in vivo* (Inwald *et al*, 2003; Prasad *et al*, 2003; Chakrabarti *et al*, 2005; Khan *et al*, 2006; Rizvi *et al*, 2008). Nuestros hallazgos sugieren que la sP-selectina y el sCD40L liberados de las plaquetas activadas pueden tener un papel en la patogénesis de la trombosis en la TE. De hecho, nuestro grupo ha observado que las plaquetas de los pacientes con TE y trombosis previa tienen una expresión aumentada de P-selectina en comparación con aquellos sin este antecedente (Arellano-Rodrigo *et al*, 2006). A este respecto, un reciente estudio de 687 pacientes con cáncer (91 con neoplasias malignas hematológicas) ha demostrado que

concentraciones elevadas de sP-selectina predice el riesgo de trombosis venosa en estos enfermos (Ay *et al*, 2008).

El FT es el principal activador de la coagulación *in vivo* y circula en plasma en forma soluble o asociado a las micropartículas procedentes de los monocitos (Furie y Furie, 2008). A pesar de la reciente descripción del aumento de la expresión de FT en monocitos y en neutrófilos en la TE (Arellano-Rodrigo *et al*, 2006; Maugeri *et al*, 2006), nosotros no hemos observamos un incremento de la expresión del FT de la plaqueta ni en la concentración de FT de forma similar a lo hallado en la PV (Kornberg *et al*, 1997). En contraste, Falanga *et al* (2007 y 2008) mostraron un aumento de la expresión de FT plaquetario en pacientes con TE cuando se comparaba con controles no apareados por edad y sexo. Por otra parte, hay que destacar que en pacientes con TE encontramos concentraciones elevadas de factor de von Willebrand (FVW:Ag), una proteína multimérica de síntesis predominantemente endotelial que juega un importante papel en la formación del trombo plaquetario (Furie y Furie, 2008), especialmente en aquellos pacientes con antecedentes personales de trombosis. Además, el aumento de la actividad del factor V se asoció de forma independiente en el análisis multivariado con un mayor riesgo trombótico. Presumiblemente, el aumento de estos factores podría resultar en una aceleración de la coagulación y en un aumento del riesgo de trombogénesis. El incremento de los valores de generación de trombina encontrados por Marchetti *et al* (2008a) en pacientes afectos de TE y PV con trombosis previa están de acuerdo con este hallazgo.

Otro hallazgo del presente estudio fue la alta prevalencia de RAPCA y su asociación independiente con un aumento del riesgo trombótico, lo que sugiere

que una reducción de la sensibilidad para la proteína C activada (PCA) puede representar un importante mecanismo de trombosis en estos pacientes. Previamente, Bucalossi *et al* (1996) detectaron la presencia de resistencia a la PCA en 3 de 20 pacientes afectados de TE y PV con trombosis en comparación con ninguno de los 11 sin trombosis. Nuestros resultados están en consonancia con el hallazgo frecuente de RAPCA en la TE y otras neoplasias hematológicas malignas mediante el uso de un ensayo de generación de trombina (Marchetti *et al*, 2008a; Negaard *et al*, 2008). Confirmando resultados previos hemos observado una disminución de los valores de proteína S (PS) libre (Bucalossi *et al*, 1996; Jensen *et al*, 2002; Marchetti *et al*, 2008a) y su relación inversa no únicamente con el estado mutacional de *JAK2* (Marchetti *et al*, 2008a), sino también con la carga alélica. Los mecanismos que causan RAPCA no están claros, pero se ha sugerido su relación con la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos, una reducción de los niveles de proteína S libre o un aumento de los valores de los factores V, VIII y FVW:Ag, como hemos observado en la presente serie (Reverter *et al*, 1996; Muñoz-Rodríguez *et al*, 2002; Negaard *et al*, 2008; Marchetti *et al*, 2008a). Sin embargo, el que nuestros hallazgos permitan identificar a pacientes con TE y alto riesgo trombótico queda pendiente de confirmación en estudios clínicos prospectivos.

Nuestro estudio también ha demostrado que los pacientes con TE y la mutación de *JAK2* tienen un aumento de las concentraciones plasmáticas de FT y de los marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial. La relación existente entre esta mutación y los marcadores de activación se analizó de nuevo teniendo en cuenta el porcentaje de alelos mutados. De este modo, se objetivó un efecto dosis del porcentaje mutacional ( $\geq 12\%$ )

asociándose con una mayor concentración de sP-selectina, sCD40L, FT y FVW:Ag. Estos hallazgos son compatibles con el aumento de la expresión de P-selectina plaquetaria en pacientes con la mutación recientemente descrito por nuestro grupo y apoya el posible papel de la mutación V617F en la activación plaquetaria en la TE (Arellano-Rodrigo *et al*, 2006). En este sentido, se ha descrito un aumento de la concentración plasmática de sP-selectina en pacientes con NMP *JAK2* positivas (Robertson *et al*, 2007). Es posible que el aumento de las señales mediadas por la sP-selectina y el sCD40L pueda incrementar la síntesis de FT por parte de las células endoteliales y monocitos (Lindmark *et al*, 2000).

La presencia de la mutación de *JAK2* se ha asociado previamente con valores más elevados de trombomodulina soluble (sTM) en la TE (Falanga *et al*, 2007). No obstante, en nuestro estudio, a pesar de observar un cierto efecto de dosis de la mutación V617F, ésta no alcanzó la significación estadística. Debido a que la sTM es un marcador inicial de daño endotelial (Boehme *et al*, 2002), es posible que la propia mutación promueva leucocitosis y un aumento de la activación plaquetaria y leucocitaria que a su vez ésta cause activación o daño endotelial mediante la liberación de proteínas solubles de adhesión, proteasas, citocinas o radicales libres de oxígeno (Falanga *et al*, 2000, 2005 y 2005a; Jensen *et al*, 2000 y 2001; Chakrabarti *et al*, 2005; Arellano-Rodrigo *et al*, 2006; Khan *et al*, 2006; Passamonti *et al*, 2006; Alvarez-Larrán *et al*, 2008; Marchetti y Falanga, 2008). Otras explicaciones alternativas podrían incluir la presencia de una célula endotelial anormal procedente de una célula madre con la mutación de *JAK2* (Jamieson *et al*, 2006; Ishii *et al*, 2006; Leibundgut *et al*, 2006; Delhommeau *et al*, 2007; Sozer *et al*, 2008 y 2009) o la síntesis

aumentada por parte de los megacariocitos, plaquetas o neutrófilos (Conway *et al*, 1992).

En conjunto, los datos del presente estudio sugieren que en la TE la mutación V617F de *JAK2* podría promover un estado pretrombótico. En este sentido, se ha descrito una mayor frecuencia de trombosis en pacientes con TE y la mutación (Baxter *et al*, 2005; Campbell *et al*, 2005; Cheung *et al*, 2006; Heller *et al*, 2006; Finazzi *et al*, 2007; Kittur *et al*, 2007; Ohyashiki *et al*, 2007a y 2008; Hsiao *et al*, 2007; Speletas *et al*, 2007; Vannucchi *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Moreno *et al*, 2008; Wong *et al*, 2008; De Stefano *et al*, 2009), aunque esta asociación no ha sido confirmada por nosotros ni en otros estudios (Antonioli *et al*, 2005; Wolanskyj *et al*, 2005; Alvarez-Larrán *et al*, 2007; Pemmaraju *et al*, 2007; Rudzki *et al*, 2007; Cervantes *et al*, 2008; Dahabreh *et al*, 2008; Ziakas, 2008; Zhang *et al*, 2008; Lussana *et al*, 2009). Además, hay que destacar que se ha encontrado un aumento de la carga mutacional de *JAK2* en pacientes afectos de TE con trombosis venosa o arterial por diferentes autores (Kittur *et al*, 2007; Antonioli *et al*, 2008; Carobbio *et al*, 2008), mientras que no se han observado diferencias significativas en los pacientes de nuestra serie ni en otro estudio (Pemmaraju *et al*, 2007), probablemente debido al reducido número de pacientes.

En conclusión, la presencia de un fenotipo de RAPCA y la elevación de la renovación plaquetaria y del factor V están relacionadas con un aumento del riesgo trombótico en pacientes con TE. La carga de los alelos mutados se asocia a una concentración más baja de PS libre y a un nivel más alto de FT y de los marcadores solubles de activación plaquetaria y endotelial.



## **VI. CONCLUSIONES**





1. Los pacientes con TE presentan un aumento de la renovación plaquetaria y una mayor activación plaquetaria, leucocitaria, endotelial y de la coagulación cuando se comparan con controles sanos apareados por edad y sexo.
2. La P-selectina plaquetaria basal e inducida por ácido araquidónico, el CD11b monocitario y el factor tisular monocitario tras estímulo con lipopolisacárido están notablemente incrementados en los pacientes con TE y complicaciones trombóticas. Este aumento de la activación plaquetaria y monocitaria podría intervenir en la patogenia de la trombosis en la TE, al facilitar la adhesión de las plaquetas y los monocitos al endotelio y promover la activación de la coagulación.
3. En la TE, la presencia de la mutación V617F de *JAK2* se relaciona con un aumento de las concentraciones plasmáticas de P-selectina soluble y CD40 ligando soluble, así como de una sobreexpresión de P-selectina basal y tras estímulo con trombina o ácido araquidónico. Dichos hallazgos apoyan un posible papel de esta mutación en la activación plaquetaria de esta enfermedad.
4. El porcentaje de plaquetas reticuladas, la resistencia adquirida a la proteína C activada y las concentraciones plasmáticas del factor V, factor VIII, factor de von Willebrand, P-selectina soluble y CD40L soluble están significativamente aumentados en los pacientes con TE y

trombosis previa. En conjunto, estas alteraciones podrían contribuir a la trombogénesis de la TE.

5. La presencia de una resistencia adquirida a la proteína C activada y el aumento de la renovación plaquetaria y del factor V se asocian a un incremento del riesgo trombótico en los pacientes con TE.
  
6. La asociación entre la carga alélica de V617F y la disminución de la proteína S libre y el aumento del factor tisular y de los marcadores de activación plaquetaria (P-selectina soluble y CD40L soluble) y endotelial (factor de von Willebrand) sugiere que esta mutación podría promover un estado pretrombótico en la TE.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114: 144–147.

Adams T, Schutz L, Goldberg L. Platelet function abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Scand J Haematol* 1974; 13: 215–224.

Afshar-Kharghan V, Lopez JA, Gray LA, Padilla A, Borthakur G, Roberts SC, Pruthi RK, Tefferi A. Hemostatic gene polymorphisms and the prevalence of thrombotic complications in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 21–24.

Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 34–39.

Ahn JY, Yoo SJ, Bang SM, Park PW, Seo YH, Shin DB, Lee JH. JAK2(V617F) mutation in Korean patients with essential thrombocythemia. *Korean J Lab Med* 2007; 27: 77–82.

Allen AJ, Gale RE, Harrison CN, Machin SJ, Linch DC. Lack of pathogenic mutations in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene in patients with non-familial essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2001; 67: 232–237.

Alvarez-Larrán A, García-Pagán JC, Abrales JG, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, Cervantes F. Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004; 124: 329–335.

Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Bellosillo B, Giralto M, Julia A, Hernandez-Boluda JC, Bosch A, Hernandez-Nieto L, Clapes V, Burgaleta C, Salvador C, Arellano-Rodrigo E, Colomer D, Besses C. Essential thrombocythemia in young individuals: Frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients. *Leukemia* 2007; 21: 1218–1223.

Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Domingo A, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet, leukocyte and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann Hematol* 2008; 87: 269–276.

Alvarez Larrán A. Papel de la activación leucocitaria y plaquetaria en la trombosis de los síndromes mieloproliferativos crónicos. Universidad de Barcelona: Tesis Doctoral, 2008.

Amitrano L, Guardascione MA, Ames PR, Margaglione M, Antinolfi I, Iannaccone L, Annunziata M, Ferrara F, Brancaccio V, Balzano A. Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders: relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease. *Am J Hematol* 2003; 72: 75–81.

Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13835–13840.

Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004; 126: 298–306.

Andrikovics H, Szilvasi A, Meggyesi N, Kiraly V, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Mikala G, Sipos A, Lovas N, Csukly Z, Mátrai Z, Tamáska J, Tordai A, Masszi T. Role of the activating mutation Val617Phe of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative diseases and significance of its detection. *Orv Hetil* 2007; 148: 203–210.

Anger BR, Seifried E, Scheppach J, Heimpel H. Budd–Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 818–825.

Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19: 1847–1849.

- Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008; 93:41–48.
- Arboix A, Besses C, Acín P, Massons JB, Florensa L, Oliveres M, Sans-Sabrafen J. Ischemic stroke as first manifestation of essential thrombocythemia. Report of six cases. *Stroke* 1995; 26: 1463–1466.
- 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.
- Arellano-Rodrigo E. Hemorragia suprarrenal bilateral y síndromes mieloproliferativos crónicos. *Med Clín (Barc)* 2008; 131: 238.
- Arellano-Rodrigo E. Papel de las plaquetas reticuladas en la evaluación clínica de la trombocitopoyesis. *Med Clín (Barc)* 2009; 133: 95–97.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol* 2009; 84: 102–108.
- Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990; 75: 1037–1050.
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 495–507.
- Austin SK, Lambert JR. The JAK2 V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol* 2008; 143: 307–320.

- Ay C, Simanek R, Vormittag R, Dunkler D, Alguel G, Koder S, Kornek G, Marosi C, Wagner O, Zielinski C, Pabinger I. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: Results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* 2008; 112: 2703–2708.
- Axelrad AA. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000; 96: 3310–3321.
- Baker RI, Manoharan A. Platelet function in myeloproliferative disorders: Characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. *Eur J Haematol* 1988; 40: 267–272.
- Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Piletta GC. Platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood in 120 patients with myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 82–86.
- Barbui T, Battista R, Dini E. Spontaneous platelet aggregation in myeloproliferative disorders. *Acta Hematol* 1973; 50: 25–29.
- Barbui T, Cortelazzo S, Viero P, Bassan R, Dini E, Semeraro N. Thrombohaemorrhagic complications in 101 cases of myeloproliferative disorders: relationship to platelet number and function. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19: 1593–1599.
- Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato LN, Marchetti M, Mazzucconi MG, Rodeghiero F, Tura S. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Experimental Hematology. *Haematologica* 2004; 89: 215–232.
- 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: 759–763.



- Barillari B, Shapiro B, Gasparini D, Rocco M, Barillari A, Buzzolo S, Moratti E. Thrombocythemia and thrombosis of the adrenal vessels. *J Endocrinol Invest* 1993; 16: 345–349.
- Balduini CL, Noris P, Spedini P, et al. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 106: 202–207.
- Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, Marranca D, Pileri A, Bertello F, Pennone M, Bassignana A, Casaccia M. Platelet behavior in essential thrombocythemia: A study of 31 cases. *Eur J Haematol* 1989; 42: 22–23.
- Bazzan M, Tamponi G, Gallo E, Stella S, Schinco PC, Pannocchia A, Pileri A. Fibrinolytic imbalance in essential thrombocythemia: Role of platelets. *Haemostasis* 1993; 23: 38–44.
- Bazzan M, Vaccarino A, Stella S, Foli C, Omede P, Gallone G, Tamponi G, Pileri A. Procoagulant activity of mononuclear cells is increased in myeloproliferative and myelodysplastic diseases. *Haemostasis* 1996; 26: 157–163.
- Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, Vaccarino A, Foli C, Gallone G, Pileri A. Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 1999; 78: 539–543.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: Analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141–149.

- Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 346–352.
- Bellosillo B, Besses C, Florensa L, Solé F, Serrano S. JAK2 V617F mutation, PRV-1 overexpression and endogenous erythroid colony formation show different coexpression patterns among Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; 20: 736–737.
- Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Gimeno E, Florensa L, Longarón R, Navarro G, Salar A, Espinet B, Solé F, Serrano S, Besses C. A higher JAK2 V617F-mutated clone is observed in platelets than in granulocytes from essential thrombocythemia patients, but not in patients with polycythemia vera and primary myelofibrosis. *Leukemia* 2007; 21: 1331–1332.
- Bellucci S, Janvier M, Tobelem G, Flandrin G, Charpak Y, Berger R, Boiron M. Essential thrombocythemias. Clinical evolutionary and biological data. *Cancer* 1986; 58: 2440–2447.
- Bellucci S, Ignatova E, Jaillet N, Boffa MC. Platelet hyperactivation in patients with essential thrombocythemia is not associated with vascular endothelial cell damage as judged by the level of plasma thrombomodulin, protein S, PAI-1, t-PA and vWF. *Thromb Haemost* 1993; 70: 736–742.
- Bellucci S, Michiels JJ. Spontaneous proliferative megakaryocytopoiesis and platelet hyperreactivity in essential thrombocythemia: Is thrombopoietin the link ? *Ann Hematol* 2000; 79: 51–58.
- Bellucci S, Michiels JJ. The Role of JAK2 V617F mutation, spontaneous erythropoiesis and megakaryocytopoiesis, hypersensitive platelets, activated leukocytes, and endothelial cells in the etiology of thrombotic manifestations in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 381–398.

- Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11: 819–848.
- Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . *J Clin Invest* 2005; 115: 3363–3369.
- Berild D, Hasselbach H, Knudsen JB. Platelet survival, platelet factor-4 and bleeding time in myeloproliferative disorders. *J Clin Invest* 1987; 47: 497–501.
- Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-selectin and platelet clearance. *Blood* 1998; 92: 4446–4452.
- Bermejo E, Alberto MF, Meschengieser SS, Lazzari MA. Assessment of platelet activation in myeloproliferative disorders with complementary techniques. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 1–6.
- Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999; 13: 150–154.
- Besses C. Factors predictius de l'aparició de complicacions vasculars greus en la trombocitèmia essencial i contribució dels cultius de progenitors megacariocítics i eritroides al diagnòstic de la malaltia. Universitat de Barcelona: Tesi Doctoral, 1999.
- Birdane A, Haznedaroğlu IC, Bavbek N, Koşar A, Büyükaşık Y, Özcebe O, Dündar SV, Kirazlı S. The plasma levels of prostanoids and plasminogen activator inhibitor-1 in primary and secondary thrombocytosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 197–201.
- Blann A, Caine G, Bareford D. Abnormal vascular, platelet and coagulation markers in primary thrombocythaemia are not reversed by treatments that reduce the platelet count. *Platelets* 2004; 15: 447–449.

- Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 2002; 107: 340–349.
- Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578–1588.
- Boneu B, Nouvel C, Sie P, Caranobe C, Combes D, Laurent G, Paris J, Bierme J. Platelets in myeloproliferative disorders. I. A comparative evaluation with certain platelet function tests. *Scand J Haematol* 1980; 25: 214–220.
- Borregaard N, Kjelsen L, Sengeløv H. Mobilization of granules in neutrophils from patients with myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol* 1993; 50: 189–199.
- Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 464–469.
- Boughton BJ, Allington MJ, King A. Platelet and plasma beta thromboglobulin in myeloproliferative syndromes and secondary thrombocytosis. *Br J Haematol* 1978; 40: 125–132.
- Boughton BJ, Jerrome DW, Rychetnik M. Chronic myeloproliferative disorders: A quantitative assessment of platelet ultrastructure. *Acta Haematol* 1980; 64: 319–323.
- Branehög I, Ridell B, Swolin B, Weinfeld A. Megakaryocyte quantifications in relation to thrombokinetics in primary thrombocythaemia and allied diseases. *Scand J Haematol* 1975; 15: 321–332.
- Brière JB. Budd–Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: Diagnosis and management. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 208–218.

- Brodsky I, Kahn SB, Ross EM, Petkov G. Platelet and fibrinogen kinetics in the chronic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1972; 30: 1444–1450.
- Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, Galieni P, Dispensa E. Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. *Am J Hematol* 1996; 52: 14–20.
- Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 425–431.
- Bumm TG, Elsea C, Corbin AS, Loriaux M, Sherbenou D, Wood L, Deininger J, Silver RT, Druker BJ, Deininger MW. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* 2006; 66: 11156–11165.
- Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol* 2002; 108: 23–28.
- Burstein SA, Malpass TW, Yee E, Kadin M, Brigden M, Adamson JW, Harker LA. Platelet factor-4 excretion in myeloproliferative disease: Implications for the aetiology of myelofibrosis. *Br J Haematol* 1984; 57: 383–392.
- Bussi L, Jean G, Le Coultre L. Ultrastructural aspects of platelets and megakaryocytes in a case of "primary" thrombocythaemia. *Acta Haematol* 1966; 35: 113–128.
- Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Correlation of GP53 and P-selectin expression in myeloproliferative disorders and normal controls. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 169–171.
- Cahill MR. P-selectin and Glycoprotein 53 expression in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2001; 112: 253.

- Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Maderna P, Parolari A, Bonzi R, De Vicenti O, Tremoli E. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1690–1696.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR. 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.
- Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355: 452–466.
- Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, Erber WN, Kusec R, Larsen TS, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Griesshammer M, Reilly JT, Cheung BY, Harrison CN, Green AR. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations and role in leukemic transformation. *Blood* 2006a; 108: 3548–3555.
- Campo G, Valgimigli M, Carletti R, Fileti L, Ferrari R. Long-term outcome after percutaneous coronary intervention in patients with essential thrombocythemia. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1235–1238.
- Cancelas JA, Garcia-Avello A, Garcia-Frade LJ. High plasma levels of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in polycythemia vera and essential thrombocythemia are associated with thrombosis. *Thromb Res* 1994; 75: 513–520.
- Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, Borrelli G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: Interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007; 109: 2310–2313.
- Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Ruggeri M, Rodeghiero F, Rambaldi A, Barbui T. Thrombocytosis and leukocytosis

interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood* 2008; 112: 3135–3137.

Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Finazzi G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008a; 26: 2732–2736.

Carulli G, Minnucci S, Azzara A, Gianfaldoni ML, Angiolini C, Sagripanti A, Ferretti A, Ambrogi F. Neutrophil functions in essential thrombocythemia. *Hematol Pathol* 1995; 9: 37–47.

Carulli G, Minnucci S, Gianfaldoni ML, Angiolini C, Azzara A, Ambrogi F. Interactions between platelets and neutrophils in essential thrombocythaemia. Effects on neutrophil chemiluminescence and superoxide anion generation. *Eur J Clin Invest* 1995a; 25: 929–934.

Cazzola M, Skoda R. Gain of function, loss of control – A molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2005; 90: 871–874.

Cerletti C, Evangelista V, de Gaetano G. P-selectin- $\beta$ 2-integrin cross-talk: A molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thromb Haemost* 1999; 82: 787–793.

Cervantes F, Tàssies D, Salgado C, Rovira M, Pereira A, Rozman C. Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: Actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. *Acta Haematol* 1991; 85: 124–127.

Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Talarn C, Gómez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: Actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol* 2002; 118: 786–790.

- Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008; 22: 905–914.
- César JM, Vecino A, Pérez-Vaquero M, Navarro JL. Phospholipid studies in platelets, plasma and red cells of patients with myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol* 1993; 50: 234–236.
- César 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: 772–777.
- Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2428–2434.
- Chaligné R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couédic JP, Fava F, Mazurier F, Godin I, Maloum K, Larbret F, Lécluse Y, Vainchenker W, Giraudier S. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007; 110: 3735–3743.
- Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, Kiladjan JJ, Socié G, Bordessoule D, Le Bousse-Kerdilès MC, Vainchenker W, Giraudier S. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G(1)/S-phase transition. *Leukemia* 2008; 22: 1557–1566.
- Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997; 97: 920–926.
- Chavda N, Manckie J, Porter JB, Harrison P, Patterson K, Machin SJ. Rapid flow cytometric quantitation of reticulated platelets in whole blood. *Platelets* 1996; 7: 189–194.



- Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: Interpretation and limitations. *Blood* 2007; 110: 1411–1419.
- Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2006; 132: 244–245.
- Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sora F, Giordano G, Urbano R, Mazzucconi MG, De Stefano V, Leone G, Sica S. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2001; 29: 670–676.
- Cho YU, Chi HS, Lee EH, Jang S, Park CJ, Seo EJ. Comparison of clinicopathologic findings according to JAK2 V617F mutation in patients with essential thrombocythemia. *Int J Hematol* 2009; 89: 39–44.
- Clezardin P, McGregor JL, Dechavanne M, Clemetson KJ. Platelet membrane glycoprotein abnormalities in patients with myeloproliferative disorders and secondary thrombocytosis. *Br J Haematol* 1985; 60: 331–344.
- Cobo F, Cervantes F, García-Pagán JC, Bosch J, Rozman C, Montserrat E. Síndrome de Budd-Chiari asociado a síndromes mieloproliferativos crónicos: Análisis de seis casos. *Med Clín (Barc)* 1996; 107: 660–663.
- Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Scenna G, Grandone E, Guardascione MA, Brancaccio V, Margaglione M. The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 55–61.
- Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT. Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 1991; 67: 2926–2930.

- Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood* 1992; 80: 1254–1263.
- Cooper B, Schafer AI, Puchalsky D, Handin RI. Platelet resistance to prostaglandin D<sub>2</sub> in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1978; 52: 618–626.
- Cooper B, Ahern D. Characterization of the platelet prostaglandin D<sub>2</sub> receptor. Loss of prostaglandin D<sub>2</sub> receptors in platelets of patients with myeloproliferative disorders. *J Clin Invest* 1979;64: 586–590.
- Cortelazzo S, Barbui T, Bassan R, Dini E. Abnormal aggregation and increased size of platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1980; 43: 127–130.
- Cortelazzo S, Colucci M, Barbui T, Dini E, Semeraro N. Reduced platelet factor X-activating activity. A Possible contribution to bleeding complications in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haemostasis* 1981; 10: 37–50.
- Cortelazzo S, Viero P, Barbui T. Platelet activation in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1981; 45: 211–213.
- Cortelazzo S, Galli M, Castagna D, Viero P, de Gaetano G, Barbui T. Increased response to arachidonic acid and U-46619 and resistance to inhibitory prostaglandins in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1988; 59: 73–76.
- Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D’Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 556–562.
- Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132–1136.

- Cortelazzo S, Marchetti M, Orlando E, Falanga A, Barbui T, Buchanan MR. Aspirin increases the bleeding side effects in essential thrombocythemia independent of the cyclooxygenase pathway: Role of the lipooxygenase pathway. *Am J Hematol* 1998; 57: 277–282.
- Crook M, Machin SJ, Crawford N. Basal and induced prothrombinase expression in platelets from patients with essential thrombocythemia (ET). *Br J Haematol* 1990; 76: 256–259.
- 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.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112: 935–945.
- Dan K, Yamada T, Kimura Y, Usui N, Okamoto S, Sugihara T, Takai K, Masuda M, Mori M, the Japanese Elderly Leukemia and Lymphoma Study Group. Clinical features of polycythemia vera and essential thrombocythemia in Japan: Retrospective analysis of a nationwide survey by the Japanese Elderly Leukemia and Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2006; 83: 443–449.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6: 372–375.
- De Stefano V, Teofili L, Leone G, Michiels JJ. Spontaneous erythroid colony formation as the clue to an underlying myeloproliferative disorder in patients with Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 411–418.
- De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, Sica S, Leone G. Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 708–714.

- De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, Micò C, Tieghi A, Cacciola RR, Santoro C, Gerli G, Vianelli N, Guglielmelli P, Pieri L, Scognamiglio F, Rodeghiero F, Pogliani EM, Finazzi G, Gugliotta L, Marchioli R, Leone G, Barbui T; GIMEMA CMD-Working Party. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: Incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008; 93: 372–380.
- De Stefano V, Za T, Rossi E, Fiorini A, Ciminello A, Luzzi C, Chiusolo P, Sica S, Leone G. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica* 2009; 94: 733–737.
- de Visser MCH, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 1271–1276.
- del Conde I, Nabi F, Tonda R, Thiagarajan P, López JA, Kleiman N. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1065–1070.
- Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Le Couedic J-P, Debili N, Saulnier P, Casadevall N, Vainchenker W, Giraudier S. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis *Blood* 2007; 109: 71–77.
- Denninger MH, Chait Y, Casadevall N, Hillaire S, Guillin MC, Bezeaud A, Erlinger S, Briere J, Valla D. Cause of portal or hepatic venous thrombosis in adults: the role of multiple concurrent factors. *Hepatology* 2000; 31: 587–591.
- Dentali F, Squizzato A, Brivio L, Appio L, Campiotti L, Crowther M, Grandi AM, Ageno W. JAK2V617F mutation for the early diagnosis of Ph- myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: A meta-analysis. *Blood* 2009; 113: 5617–5623.

- Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004; 103: 4198–4200.
- Dusa A, Staerk J, Elliott J, Pecquet C, Poirel HA, Johnston JA, Constantinescu SN. Substitution of pseudokinase domain residue V617 by large nonpolar amino acids causes activation of JAK2. *J Biol Chem* 2008; 283: 12941–12948.
- Eche N, Sie P, Caranobe C, Nouvel C, Pris J, Boneu B. Platelets in myeloproliferative disorders. III: Glycoprotein profile in relation to platelet function and platelet density. *Scand J Haematol* 1981; 26: 123–129.
- El-Kassar N, Hetet G, Li Y, Briere J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1995; 90: 131–137.
- El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997; 89: 128–134.
- El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 181–188.
- Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 275–290.
- Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische thrombozythamie bei vascularer schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 1934; 293: 233–248.
- Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: p-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent

CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93: 876–885.

Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S, Dell'elba G, Pecce R, Martelli N, Federico L, Rojas M, Berton G, Lowell CA, Totani L, Smyth SS. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007; 109: 2461–2469.

Fabris F, Randi M, Casonato A, Girolami A. The possible value of platelet aggregation studies in patients with increased platelet number. *Blut* 1981; 43: 279–285.

Fabris F, Randi M, Casonato A, Dal Bo Zanon R, Bonvicini P, Girolami A. Clinical significance of beta-thromboglobulin in patients with high platelet count. *Acta Haematol* 1984; 71: 32–38.

Falanga A, Ofosu FA, Cortelazzo S, Delaini F, Marziali S, Barbui T. Hemostatic system activation in patients with lupus anticoagulant and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 1994; 20: 324–327.

Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manarini S, Oldani E, Giovanelli S, Galbusera M, Cerletti C, Barbui T. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1999; 93: 2506–2514.

Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; 96: 4261–4266.

Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005; 33: 523–530.

Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: The role of neutrophils. *Semin Hematol* 2005a; 42: 239–247.

- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: Relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007; 35: 702–711.
- Falanga A, Barbui T, Rickles FR. Hypercoagulability and tissue factor gene upregulation in hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 204–210.
- Fanger H, Cella Jr LJ, Litchman H. Thrombocythemia: Report of three cases and review of literature. *N Engl J Med* 1954; 250:456–461.
- Faraday N, Scharpf RB, Dodd-o JM, Martinez EA, Rosenfeld BA, Dorman T. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology* 2001; 94: 145–151.
- Faurschou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbalch HC. High prevalence of hyperhomocysteinemia due to marginal deficiency of cobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2000; 65: 136–140.
- Feliu E, Centurión ME, Rozman C. Estudio morfométrico y ultraestructural de los megacariocitos como método diagnóstico entre la trombocitemia esencial y la trombocitosis secundaria. *Sangre* 1986; 31: 272–275.
- Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauters F. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer* 1990; 66: 549–556.
- Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981; 58: 916–919.
- Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 1997; 77: 181–185.

- Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. Bleeding time and platelet function in thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 1: 71–78.
- Finazzi G, Barbui T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008; 22: 1494–1502.
- Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica* 2007; 92: 135–136.
- Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1152–1160.
- Florensa L, Besses C, Woessner S, Solé F, Acín P, Pedro C, Sans-Sabrafen J. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythemia. *Leukemia* 1995; 9: 271–273.
- Florensa L, Bellosillo B, Besses C, Puigdecenet E, Espinet B, Pérez-Vila E, Longarón R, Vilà RM, Solé F, Serrano S. JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 1903–1904.
- Friedenberg WR, Roberts RC, David DE. Relationship of thrombohemorrhagic complications to endothelial cell function in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1992; 40: 283–289.
- Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004; 10: 171–178.
- Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; 359: 938–949.



- Gale RE, Allen AJR, Nash MJ, Linch DC. Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for many years. *Blood* 2007; 109: 1241–1243.
- Gangat N, Wolanskyj AP, Tefferi A. Abdominal vein thrombosis in essential thrombocythemia: Prevalence, clinical correlates, and prognostic implications. *Eur J Haematol* 2006; 77: 327–333.
- Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, Tefferi A. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: A single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007; 21: 270–276.
- Gangat N, Wolanskyj AP, Schwager S, Tefferi A. Predictors of pregnancy outcome in essential thrombocythemia: A single institution study of 63 pregnancies. *Eur J Haematol* 2009; 82: 350–353.
- Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeißer A, Yilmaz A, Ludwing J, Neundörfer B, Daniel WG. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34: 1412–1418.
- Ganti AK, Potti A, Koka VK, Pervez H, Mehdi SA. Myeloproliferative syndromes and the associated risk of coronary artery disease. *Thromb Res* 2003; 110: 83–86.
- van Genderen PJ, Michiels JJ. Erythromelalgic, thrombotic and haemorrhagic manifestations of thrombocythaemia. *Presse Med* 1994; 23: 73–77.
- van Genderen PJ, Michiels JJ, Zijlstra FJ. Lipoxygenase deficiency in primary thrombocythemia is not a true deficiency. *Thromb Haemost* 1994a; 71: 803–804.
- van Genderen P, Michiels JJ. Hydroxyurea in essential thrombocytosis. *N Engl J Med* 1995; 333: 802–803.

- van Genderen P, Michiels JJ, van Strik R, Lindemans J, van Vliet HHDM. Platelet consumption in thrombocythemia complicated by erythromelalgia: Reversal by aspirin. *Thromb Haemost* 1995; 73: 210–214.
- van Genderen PJ, Budde U, Michiels JJ, van Strik R, van Vliet HH The reduction of large von Willebrand factor multimers in plasma in essential thrombocythaemia is related to the platelet count. *Br J Haematol* 1996; 93: 962–965.
- van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R, Vuzevski VD, Prins FJ, van Vliet HH, Michiels JJ. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost* 1996a; 76: 333–338.
- van Genderen PJ, Prins FJ, Lucas IS, van de Moesdijk D, van Vliet HH, van Strik R, Michiels JJ. Decreased half-life time of plasma von Willebrand factor collagen binding activity in essential thrombocythaemia: normalization after cytoreduction of the increased platelet count. *Br J Haematol* 1997; 99: 832–836.
- van Genderen PJ, Prins FJ, Michiels JJ, Schror K. Thromboxane-dependent platelet activation in vivo precedes arterial thrombosis in thrombocythaemia: a rationale for the use of low-dose aspirin as an antithrombotic agent. *Br J Haematol* 1999; 104: 438–441.
- Gersuk GM, Carmel R, Pattengale PK. Platelet-derived growth factor concentrations in platelet-poor plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1989; 74: 2330–2334.
- Gerwitz AM, Bruno E, Elwell J, Hoffman R. In vitro studies of megakaryocytopoiesis in thrombocytic disorders of man. *Blood* 1983; 61: 384–389.
- Ginsburg AD. Platelet function in patients with high platelet counts. *Ann Intern Med* 1975; 82: 506–511.

- Girodon F, Jooste V, Maynadié M, Favre B, Schaeffer C, Carli PM. Incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the Côte d'Ór area, France, during 1980–99. *J Intern Med* 2005; 258: 90–91.
- Gisslinger H, Rodeghiero F, Ruggeri M, Heis-Vahidi Fard N, Mannhalter C, Papagiannopoulos M, Rintelen C, Lalouschek W, Knöbl P, Lechner K, Pabinger I. Homocysteine levels in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1999; 105: 551–555.
- Gisslinger H, Mullner M, Pabinger I, Heis-Vahidi-Fard N, Gisslinger B, Brichta A, Bachleitner-Hofmann T, Mannhalter C. Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study. *Haematologica* 2005; 90: 408–410.
- Goel MS, Diamond SL. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and –independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 2093–2098.
- Goerttler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel H, Pahl HL. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005; 106: 2862–2864.
- Goerttler PS, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Kutti J, Moliterno A, Marchioli R, Spivak JL, Pahl HL. Thrombotic and bleeding complications in four subpopulations of patients with essential thrombocythemia defined by c-Mpl protein expression and PRV-1 mRNA levels. *Haematologica* 2005a; 90: 851–853.
- Goldman JM. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1744–1746.
- Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B, Grunewald M, Bangerter M, Bergmann L. Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1999; 96: 191–196.

- Griesshammer M, Struve S, Barbui T. Management of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders in pregnancy. *Blood Rev* 2008; 22: 235–245.
- Grossi A, Vannucchi AM, Rafanelli D, Filimberti E, Ferrini PR. Beta-thromboglobulin content in megakaryocytes of patients with myeloproliferative diseases. *Thromb Res* 1986; 43: 367–374.
- Gunz FW. Hemorrhagic thrombocytopenia: A critical review. *Blood* 1960; 15: 706–723.
- Gupta V, Gylling A, Alonso JL, Sugimori T, Ianakiev P, Xiong JP, Arnaout MA. The  $\beta$ -tail domain ( $\beta$ TD) regulates physiologic ligand binding to integrin CD11b/CD18. *Blood* 2007; 109: 3513–3520.
- Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikian M, Tellez A, DeLao T, Granada JF, Dong JF, Kleiman NS, Lev EI. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 743–749.
- Hagberg IA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets* 2000; 11: 137–150.
- Handa M, Watanabe K, Kawai Y, Kamata T, Koyama T, Nagai H, Ikeda Y. Platelet unresponsiveness to collagen: Involvement of glycoprotein Ia-IIa (alpha 2 beta 1 integrin) deficiency associated with a myeloproliferative disorder. *Thromb Haemost* 1995; 73: 521–528.
- Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992; 7: 1347–1353.
- Harrison CN, Gale RE, Wiestner AC, Skoda RC, Linch DC. The activating splice mutation in intron 3 of the thrombopoietin gene is not found in patients with non-familial essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1998; 102: 1341–1343.

Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999; 93: 417–424.

Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, Machin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999a; 107: 139–147.

Harrison CN, Donohoe S, Carr P, Dave M, Mackie I, Machin S. Patients with essential thrombocythaemia have an increased prevalence of antiphospholipid antibodies which may be associated with thrombosis. *Thromb Haemost* 2002; 87: 802–807.

Harrison CN. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *Br J Haematol* 2005; 129: 293–306.

Harrison CN. Essential thrombocythaemia: challenges and evidence-based management. *Br J Haematol* 2005a; 130: 153–165.

Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005b; 353: 33–45.

Harrison P, Robinson MSC, Manckie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets* 1997; 8: 379–383.

Harrison P, Goodall AH. “Message in the Platelet”- more than just vestigial mRNA ! *Platelets* 2008; 19: 395–404.

Hattori N, Fukuchi K, Nakashima H, Maeda T, Adachi D, Saito B, Yanagisawa K, Matsuda I, Nakamaki T, Gomi K, Tomoyasu S. Megakaryopoiesis and platelet function in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with JAK2 V617F mutation. *Int J Hematol* 2008; 88: 181–188.

- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1104–1111.
- Hehlmann R, Jahn M, Baumann B, Köpcke W. Essential thrombocythemia. Clinical characteristics and course of 61 cases. *Cancer* 1988; 61: 2487–2496.
- Heller PG, Lev PR, Salim JP, Kornblihtt LI, Goette NP, Chazarreta CD, Glembotsky AC, Vassallu PS, Marta RF, Molinas FC. 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.
- Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck R. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporarily limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; 98: 1047–1054.
- Hernández MR, Escolar G, Bozzo J, Galán AM, Ordinas A. Inhibition of fibrin deposition on the subendothelium by a monoclonal antibody to polymorphonuclear leukocyte integrin CD11b. Studies in a flow system. *Haematologica* 1997; 82: 566–571.
- Hexner EO. JAK2 V617F: Implications for thrombosis in myeloproliferative diseases. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 450–454.
- Higgs JR, Sadek I, Neumann PE, Ing VW, Renault NK, Berman JN, Greer WL. Familial essential thrombocythemia with spontaneous megakaryocyte colony formation and acquired JAK2 mutations. *Leukemia* 2008; 22: 1151–1156.
- Hoffman M, Monroe DM III. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 958–965.
- Holme S, Murphy S. Studies of the platelet density abnormality in myeloproliferative disorders. *J Lab Clin Med* 1984; 103: 373–383.

- Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W et al. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 2007; 109: 4924–4929.
- Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997; 90: 4031–4038.
- Horn T, Kremer M, Dechow T, Pfeifer WM, Geist B, Perker M, Duyster J, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Detection of the activating JAK2V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases. *J Mol Diagn* 2006; 8: 299–304.
- Hortner M, Nielsch U, Mayr LM, Heinrich PC, Haan S. A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2516–2526.
- Hsiao HH, Yang MY, Liu YC, Lee CP, Yang WC, Liu TC, Chang CS, Lin SF. The association of JAK2V617F mutation and leukocytosis with thrombotic events in essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2007; 35: 1704–1707.
- Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001; 8: 1327–1338.
- Hussein K, Theophile K, Denzer K, Kreipe H, Bock O. Expression of adhesion factor CD239 in bone marrow cells in chronic myeloproliferative diseases. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 28: 299–303.
- Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673–687.
- Iki S, Yuo A, Yagisawa M, Inuo EK, Inoue Y, Usuki K, Urabe A, Suzuki K, Kitagawa S, Togawa A, Takaku F. Increased neutrophil respiratory burst in myeloproliferative

disorders: selective enhancement of superoxide release triggered by receptor-mediated agonists and low responsiveness to in vitro cytokine stimulation. *Exp Hematol* 1997; 25: 26–33.

Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003; 92: 1041–1048.

Ireland H, Lane DA, Wolff S, Foadi M. In vivo platelet release in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1982; 48: 41–45.

Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 3128–3134.

Jabaily J, Iland HJ, Laszlo J, Massey EW, Faguet GB, Brière J, Landaw SA, Pisciotta A. Neurologic manifestations of essential thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1983; 99: 513–518.

Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109: 5087–5095.

James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144–1148.

James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: Pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005a; 11: 546–554.

James C. The JAK2 V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: One mutation for three diseases ? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 69–75.



- Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, Jones C, Zehnder JL, Lilleberg SL, Weissman IL. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6224–6229.
- Janssen JW, Anger BR, Drexler HG, Bartram CR, Heimpel H. Essential thrombocythemia in two sisters originating from different stem cell levels. *Blood* 1990; 75: 1633–1636.
- Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Anttila P, Hormila P, Jansson SE, Kekomäki R, Ruutu T. Essential thrombocythemia at diagnosis: causes of diagnostic evaluation and presence of positive diagnostic findings. *Ann Hematol* 1998; 77: 101–106.
- Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Anttila P, Ruutu T. Development of erythrocytosis in the course of essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 1999; 78: 219–222.
- Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Anttila P, Ruutu T. The predictive value of vascular risk factors and gender for the development of thrombotic complications in essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2001; 80: 74–78.
- Järemo P. Platelet density in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Platelets* 1999; 10: 61–63.
- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3370–3373.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur J Haematol* 2000; 65: 132–139.

Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000a; 110: 116–124.

Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselblach HC. Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol* 2001; 66: 143–151.

Jensen MK, de Nully Brown P, Thorsen S, Hasselbalch HC. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2002; 69: 185–191.

Johansson P, Ricksten A, Wennstrom L, Palmqvist L, Kutti J, Andreasson B. Increased risk for vascular complications in PRV-1 positive patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 513–516.

Johansson P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hemost Thromb* 2006; 32: 171–173.

Johnson M, Gernsheimer T, Johansen K. Essential thrombocytosis: underemphasized cause of large-vessel thrombosis. *J Vasc Surg* 1995; 22: 443–447.

Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162–2168.

Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Waghorn K, Kreil S, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F Cross NC. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41: 446–449.

Kaftan O, Balcik OS, Cipil H, Ozet G, Bavbek N, Koşar A, Dagdas S. Plasma levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in primary and secondary thrombocytosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 449–454.

Kaplan R, Gabbeta J, Sun L, Mao GF, Rao AK. Combined defect in membrane expression and activation of platelet GPIIb-IIIa complex without primary sequence abnormalities in myeloproliferative disease. *Br J Haematol* 2000; 111: 954–964.

Kaplar M, Kappelmayer J, Kiss A, Szabo K, Udvardy M. Increased leukocyte-platelet adhesion in chronic myeloproliferative disorders with high platelet counts. *Platelets* 2000; 11: 183–184.

Karakantza M, Giannakoulas NC, Zikos P, Sakellaropoulos G, Kouraklis A, Aktypi A, Metallinos IC, Theodori E, Zoumbos NC, Maniatis A. Markers of endothelial and *in vivo* platelet activation in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Int J Hematol* 2004; 79: 253–259.

Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1044: 139–141.

Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005a; 105: 4187–4190.

Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006; 354: 2034–2045.

Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N Engl J Med* 1978; 299: 505–509.

Kessler CM, Klein HG, Havlik RJ. Uncontrolled thrombocytosis in chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1982; 50: 157–167.

- Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJD, Silliman CC. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2006; 108: 2455–2462.
- Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol* 2006; 134: 366–384.
- Kiladjian JJ, Elkassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B, Gardin C. Study of the thrombopoietin receptor in essential thrombocythemia. *Leukemia* 1997; 11: 1821–1826.
- Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N, Conejero C, Briere J, Fenaux P, Chomienne C, Grandchamp B. Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* 2006; 20: 1181–1183.
- Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek F, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, Cazals-Hatem D, Plessier A, Garcia-Pagan JC, Murad SD, Raffa S, Janssen HL, Gardin C, Cereja S, Tonetti C, Giraudier S, Condat B, Casadevall N, Fenaux P, Valla DC. Role of JAK2 mutation deletion in Budd-Chiari Syndrome (BCS) and portal vein thrombosis associated to MPD. *Blood* 2008; 111: 4922–4929.
- Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, Bass A, Marubayashi S, Heguy A, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Offit K, Stone RM, Gilliland DG, Klein RJ, Levine RL. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41: 455–459.
- Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finkie CM, Gangat N, Wolanskyj AP, Li C-Y, Wu W, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007; 109: 2279–2284.

- Kojima K, Takata S, Tezen T, Motikawa T, Itoshima T, Shinagawa K, Tanimoto M. Bilateral adrenal hemorrhage in essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2002; 81: 350–351.
- Komatsu N, Suda T, Sakata Y, Eguchi M, Kaji K, Saito M, Miura Y. Megakaryocytopoiesis in vitro of patients with essential thrombocythaemia: Effect of plasma and serum on megakaryocytic colony formation. *Br J Haematol* 1986; 64: 241–252.
- Kornberg A, Rahimi-Levene N, Yona R, Mor A, Rachmilewitz E. Enhanced generation of monocyte tissue factor and increased plasma prothrombin fragment 1+2 levels in patients with polycythemia vera: mechanism of activation of blood coagulation. *Am J Hematol* 1997; 56: 5–11.
- Kornblihtt LI, Heller PG, Correa G, Castañón M, Genoud V, Vassallu P, Sarano J, Kordich L, Molinas FC. Associated thrombophilic defects in essential thrombocythemia: their relationship with clinical manifestations. *Thromb Res* 2003; 112: 131–135.
- Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; 22: 1828–1840.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30: 229–236.
- Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003, 102: 1869–1871.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–1790.
- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, Passamonti F, Pietra D, Cazzola M, Skoda RC. Altered gene expression in myeloproliferative disorders

correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005a; 106: 3374–3376.

Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 1377–1380.

Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; 22: 1841–1848.

Kundrapu K, Colenberg LT, Duhe RJ. Activation loop tyrosines allow the JAK2(V617F) mutant to attain hyperactivation. *Cell Biochem Biophys* 2008; 52: 103–112.

Kuo YR, Yang KD, Huang MN, Wei FC, Jeng SF. Reactive thrombocytosis without endothelial damage does not affect the microvascular anastomotic patency. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 57–63.

Kurzrock R, Cohen PR. Erythromelalgia: Review of clinical characteristics and pathophysiology. *Am J Med* 1991; 91: 416–422.

Kwaan HC, Wang J. Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 451–458.

Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Moreau GF, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108: 1652–1660.

Lahuerta-Palacios JJ, Bornstein R, Fernández-Debora FJ, Gutiérrez-Rivas E, Ortiz MC, Larregla S, Calandre L, Montero-Castillo J. Controlled and uncontrolled thrombocytosis. Its clinical role in essential thrombocythemia. *Cancer* 1988; 61: 1207–1212.

Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis

among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 2008; 112: 2199–2204.

Landolfi R, De Cristofaro R, Castagnola M, De Candia E, D'Onofrio G, Leone G, Bizzi B. Increased platelet-fibrinogen affinity in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1988; 71: 978–982.

Landolfi R, Marchioli R, Patrono C. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1995; 78: 617–621.

Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350: 114–124.

Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Pathogenetic mechanisms and prevention. *B Prac Res Clin Haematol* 2006; 19: 617–633.

Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 2008; 22: 2020–2028.

Lawler J, Cohen AM, Chao FC, Moriarty DJ. Thrombospondin in essential thrombocythemia. *Blood* 1986; 67: 555–558.

Lee LH, Baglin T. Altered platelet phospholipid-dependent thrombin generation in thrombocytopenia and thrombocytosis. *Br J Haematol* 1995; 89: 131–136.

Leibundgut EO, Horn MP, Brunold C, Pfanner-Meyer B, Marti D, Hirsiger H, Tobler A, Zwicky C. Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica* 2006; 91: 1465–1472.

Lengfelder E, Hochhaus A, Kronawitter U, Höche D, Queisser W, Jahn-Eder M, Burkhardt R, Reiter A, Ansari H, Hehlmann R. Should a platelet limit of  $600 \times 10^9/L$

be used as a diagnostic criterion in essential thrombocythaemia ? An analysis of the natural course including early stages. *Br J Haematol* 1998; 100: 15–23.

Leoncini G, Maresca M, Buzzi E, Piana A, Armani U. Platelets of patients affected with essential thrombocythemia are abnormal in plasma membrane and adenine nucleotide content. *Eur J Haematol* 1990; 44: 115–119.

Leone G, Sica S, Chiusolo P, Teofili L, De Stefano V. Blood cell diseases and thrombosis. *Haematologica* 2001; 86: 1236–1244.

Lessiani G, Dragani A, Falco A, Fioritoni F, Santilli F, Davi G. Soluble CD40 ligand and endothelial dysfunction in aspirin-treated polycythaemia vera patients. *Br J Haematol* 2009; 145: 538–540.

Levine J, Swanson PD. Idiopathic thrombocytosis. A treatable cause of transient ischemic attacks. *Neurology* 1968; 18: 711–713.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387–397.

Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107: 4139–4141.

Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 673–683.

Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112: 2190–2198.



- Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 2001; 14: 27–37.
- Lindmark E, Tenno T, Seigbahn A. Role of P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2322–2328.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 1865–1867.
- Lofvenberg E, Nilson TK. Qualitative platelet defects in chronic myeloproliferative disorders—Evidence for reduced ATP secretion. *Eur J Haematol* 1989; 43: 435–440.
- Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993; 92: 559–570.
- Lowe GDO. Can haematological tests predict cardiovascular risk ? The 2005 Kettle Lecture. *Br J Haematol* 2006; 133: 232–250.
- Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18962–18967.
- Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem* 2006; 281: 7002–7011.
- Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Büller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: A systematic review. *Thromb Res* 2009; 124: 409–417.

- Ma ACH, Ward AC, Liang R, Leung AYH. The role of jak2a in zebrafish hematopoiesis. *Blood* 2007; 110: 1824–1830.
- Ma YQ, Plow EF, Geng JG. P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of  $\alpha M\beta 2$  activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood* 2004; 104: 2549–2556.
- Ma X, Vanasse G, Cartmel B, Wang Y, Selinger HA. Prevalence of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2008; 83: 359–362.
- Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015–1022.
- Maldonado JE, Pintado I, Pierre RV. Dysplastic platelets and circulating megakaryocytes in chronic myeloproliferative diseases. I. The platelets: Ultrastructure and peroxidase reaction. *Blood* 1974; 43: 797–809.
- Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2 V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2008; 36: 148–159.
- Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H, Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2008a; 112: 4061–4068.
- Maresca M, Armani U, Cella A, Piana A, Leoncini G. Cytoskeleton protein composition upon platelet stimulation with thrombin in essential thrombocythemia. *Haematologica* 1993; 78: 25–29.
- Martínez-Avilés L, Besses C, Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92: 1717–1718.

- Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1323–1330.
- Maugeri N, Giordano G, Petrilli MP, Fraticelli V, de Gaetano G, Cerletti C, Storti S, Donati MB. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: A new effect for an old drug? *J Thromb Haemost* 2006a; 4: 2593–2598.
- Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MT, Piccoli A, Totani L, Cianflone D, Maseri A, Manfredi AA. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: A phosphatidylserine, P-selectin and  $\beta 2$  integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 2009; 113: 5254–5265.
- Mayordomo O, Carcamo C, Vecino AM, Navarro JL, César JM. Arachidonic acid metabolism in platelets of patients with essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1995; 78: 315–321.
- 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 and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function. *Br J Haematol* 1989; 73: 369–374.
- McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 746–756.
- McMahon C, bu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 736–743.
- Menon KV, Shah V, Kamath PS. The Budd-Chiari syndrome. *N Engl J Med* 2004; 350: 578–585.
- Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 2000; 102: 2045–2050.

- Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000; 102: 1931–1936.
- Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976–1995. *Am J Hematol* 1999; 61: 10–15.
- Michiels JJ, Abels J, Steketee J, van Vliet HH, Vuzevski VD. Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1985; 102: 466–471.
- Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, van Vliet HHDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993; 43: 1107–1110.
- Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 1: 47–56.
- Michiels JJ, van Genderen PJ, Jansen PHP, Koudstaal PJ. Atypical transient ischemic attacks in thrombocythemia of various myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 1: 65–70.
- Michiels JJ. Erythromelalgia and thrombocythemia: a disease of platelet prostaglandin metabolism—thesis, Rotterdam, 1981. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 335–338.
- Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Krestin GP. Bilateral adrenal swelling as a cause of chest, back, and upper abdominal pain in essential thrombocythemia and polycythemia vera is due to microvascular ischemic thrombosis rather than to hemorrhage. *Ann Hematol* 2002; 81: 691–694.
- Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, van der Planken M, De Raeve H, Schroyens W. Clinical and laboratory features, pathobiology of platelet-mediated thrombosis and bleeding complications, and the molecular etiology of essential thrombocythemia and polycythemia vera: Therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 174–207.

- Michiels JJ, Commandeur S, Hoogenboom GJ, Wegman JJ, Scholten L, van Rijssel RH, De Raeve H. JAK2V617F positive early stage myeloproliferative disease (essential thrombocythemia) as the cause of portal vein thrombosis in two middle-aged women: therapeutic implications in view of the literature. *Ann Hematol* 2007; 86: 793–800.
- Middeldorp S, van Hylkama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients ? *Br J Haematol* 2008; 143: 321–335.
- Mistry R, Cahill M, Chapman C, Wood JK, Barnett DB. <sup>125</sup>I-fibrinogen binding to platelets in myeloproliferative disease. *Thromb Haemost* 1991; 66: 329–333.
- Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, Geissler K, Lechner K, Mannhalter C. Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (HUMARA). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 93–100.
- Mitus AJ, Barbui T, Shulman LN, Rosenthal DS, Viero P, Cortelazzo S, Schafer AI. Hemostatic complications in young patients with essential thrombocythemia. *Am J Med* 1990; 88: 371–375.
- Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338: 572–580.
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood* 2006; 108: 3913–3915.
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Exp Hematol* 2008; 36: 1480–1486.

- Moore A, Nachman RL. Platelet Fc receptor: Increased expression in myeloproliferative disease. *J Clin Invest* 1981; 67: 1064–1071.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381–1389.
- Moreno MJ, Lozano ML, Roldán V, Bellosillo B, García-Barberá N, Rivera J, Navarro-Núñez L, Besses C, Vicente V, Martínez C. JAK2 V617F, hemostatic polymorphisms, and clinical features as risk factors for arterial thrombotic events in essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2008; 87: 763–765.
- Morgan D, Brodsky I. Human endogenous retrovirus (HERV-K) particles in megakaryocytes cultured from essential thrombocythemia peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 2004; 32: 520–525.
- Morgan KJ, Gilliland DG. A Role for JAK2 mutations in myeloproliferative diseases. *Annu Rev Med* 2008; 59: 371–380.
- Muñoz-Rodríguez FJ, Reverter JC, Font J, Tàssies D, Espinosa G, Cervera R, Carmona F, Balsch J, Ingelmo M, Ordinas A. Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002; 11: 730–735.
- Murugesan G, Samer A, Szpurka H, Verbic MA, Maciejewski JP, Tubbs RR, Hsi ED. Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 625–633.
- Musolino C, Alonci A, Allegra A, Spatari G, Bellomo G, Tringali O, Quartarone C, Squadrito G, Quartarone M. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in patients with chronic myeloproliferative disorders and thromboembolic complications. *Am J Hematol* 1998; 57: 109–112.
- Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Tringali O, Spatari G, Quartarone C, Rizzo V, Calabrò L, Bagnato G, Frisina N. Markers of endothelial and platelet status in

patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Hematology* 2000; 4: 397–402.

Mustjoki S, Borze I, Lasho TL, Alitalo R, Pardanani A, Knuutila S, Juvonen E. *JAK2V617F* mutation and spontaneous megakaryocytic or erythroid colony formation in patients with essential thrombocythaemia (ET) or polycythaemia vera (PV). *Leuk Res* 2009; 33: 54–59.

Negaard HFS, Iversen PO, Ostenstad B, Mowinckel MC, Sandset PM. Increased acquired activated protein C resistance in unselected patients with hematological malignances. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1482–1487.

Neemeh JA, Bowie EJW, Thompson JH, Didisheim P, Owen CA. Quantitation of platelet aggregation in myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1972; 57: 336–347.

Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998; 93: 397–409.

Neunteufl T, Heher S, Stefenelli T, Pabinger I, Gisslinger H. Endothelial dysfunction in patients with in patients with polycythemia vera. *Br J Haematol* 2001; 115: 354–359.

Niittyvuopio R, Juvonen E, Kekomäki R, Oksanen K, Anttila P, Ruutu T. The predictive value of megakaryocytic and erythroid colony formation and platelet function tests on the risk of thromboembolic and bleeding complications in essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2004; 72: 245–251.

Nishimura J, Okamoto S, Ibayashi H. Abnormalities of platelet adenine nucleotides in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1979; 41: 787–795.

Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960; 25: 85–109.

- Nurden P, Bihour C, Smith M, Raymond JM, and Nurden AT. Platelet activation and thrombosis: Studies in a patient with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 1996; 51: 79–84.
- Oehler L, Jaeger E, Eser A, Sillaber C, Gisslinger H, Geissler K. Imatinib mesylate inhibits autonomous erythropoiesis in patients with polycythemia vera in vitro. *Blood* 2003; 102: 2240–2242.
- Ogata J, Yonemura K, Kimura K, Yutani C, Minematsu K. Cerebral infarction associated with essential thrombocythaemia: An autopsy case study. *Cerebrovasc Dis* 2005; 19: 201–205.
- Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Ohyashiki JH. JAK2(V617F) mutational status as determined by semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay is linked to clinical features in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007; 21: 1097–1099.
- Ohyashiki K, Ito Y, Hori K, Sato K, Makino T, Ohyashiki JH. Thrombosis can occur at any phase of essential thrombocythemia with JAK2<sup>V617F</sup> mutation: A single institutional study in Japan. *Leukemia* 2007a; 21: 1570–1571.
- Ohyashiki K, Kiguchi T, Ito Y, Fujimoto H, Gotoh A, Tauchi T, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH. Leukocytosis is linked to thrombosis at diagnosis, while JAK2 V617F mutation is associated with thrombosis during the course of essential thrombocythemia. *Int J Hematol* 2008; 87: 446–448.
- Okuma M, Uchino H. Altered arachidonate metabolism by platelets in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1979; 54: 1258–1271.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41: 450–454.
- Østerud B. Tissue factor expression by monocytes: Regulation and pathophysiological role. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: S9–S14.



- Ozer FL, Traux WE, Miesch DC, Levin WC. Primary hemorrhagic thrombocythemia. *Am J Med* 1960; 28: 807–823.
- Pachipala K, Gutknecht D. Bilateral adrenal hemorrhage associated with essential thrombocytosis. *Am J Hematol* 2006; 81: 150–151.
- Palandri A, Ottaviani E, Salmi F, Catani L, Polverelli N, Fiacchini M, Martinelli G, Baccarani M, Vianelli N. JAK2V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 247–253.
- Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 2007; 109: 5242–5250.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472–3476.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111: 2785–2789.
- Pareti FI, Gugliotta L, Mannucci L, Guarini A, Mannucci PM. Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1982; 47: 84–89.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998; 93: 385–395.
- Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzani P, Valentini F, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2004; 117: 755–761.

- Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, Bonfichi M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2004a; 126: 650–656.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107: 3676–3682.
- Passamonti F, Randi ML, Rumi E, Pungolino E, Elena C, Pietra D, Scapin M, Arcaini L, Tezza F, Moratti R, Pascutto C, Fabris F, Morra E, Cazzola M, Lazzarino M. Increased risk of pregnancy complications in patients with essential thrombocythemia carrying the JAK2 (617V>F) mutation. *Blood* 2007; 110: 485–489.
- Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: A study of 605 patients. *Haematologica* 2008; 93:1645–1651.
- Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, ThanigaikumarM, Yallop D, Arya R, Pagliuca A, Gaken J, Wendon J, Heaton ND, Mufti GJ. Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd–Chiari syndrome. *Gastroenterology* 2006; 130: 2031–2038.
- Pemmaraju N, Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. The quantitative JAK2 V617F neutrophil allele burden does not correlate with thrombotic risk in essential thrombocytosis. *Leukemia* 2007; 21: 2210–2212.
- Percy MJ, Rumi E. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis. *Am J Hematol* 2008; 84: 46–54.
- Perelló A, García-Pagán JC, Gilabert R, Suárez Y, Moitinho E, Cervantes F, Reverter JC, Escorsell A, Bosch J, Rodés J. TIPS is a useful long-term derivative therapy for

patients with Budd-Chiari syndrome uncontrolled by medical therapy. *Hepatology* 2002; 35: 132–139.

Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* 1999; 106: 391–399.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270.

Plo I, Nakatake M, Malivert L, de Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L, Vainchenker W. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: Potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112: 1402–1412.

Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. Expression, activation, and function of integrin  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; 112: 2327–2335.

Posan E, Ujj G, Kiss A, Telek B, Rak K, Udvardy M. Reduced *in vitro* clot lysis and release of more active platelet PAI-1 in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Thromb Res* 1998; 90: 51–56.

Prasad KSS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces  $\beta 3$  integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12367–12371.

Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974; 290: 1382.

- Presseizen K, Friedman Z, Shapiro H, Radnay J, Ellis MH. Phosphatidylserine expression on the platelet membrane of patients with myeloproliferative disorders and its effect on platelet-dependent thrombin formation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002; 8: 33–39.
- Preston FE, Emmanuel IG, Winfield DA, Malia RG. Essential thrombocytemia and peripheral gangrene. *Br Med J* 1974; 3: 548–552.
- Prieto R, Martínez-Sellés M, Fernández-Aviles F. Essential thrombocytemia and acute coronary syndrome: Clinical profile and association with other thromboembolic events. *Acute Cardiac Care* 2008; 10: 116–120.
- Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R, Dell'Era A, Bucciarelli P, Mannucci PM. Role of the JAK2V617F mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006; 44: 1528–1534.
- Puigdecanet E, Espinet B, Lozano JJ, Sumoy L, Bellosillo B, Arenillas L, Alvarez-Larrán A, Solé F, Serrano S, Besses C, Florensa L. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocytemia. *Leukemia* 2008; 22: 1368–1376.
- Randi ML, Meneghin C, Zerbinati P, Sbarai A, Rampin E, Pasini R, Zanin L, Girolami A, Cella G. Soluble plasma thrombomodulin levels in patients with chronic myeloproliferative disorder. *Clin Appl Thromb Hemost* 1999; 5: 43–47.
- Randi ML, Rossi C, Fabris F, Girolami A. Essential thrombocytemia in young adults: major thrombotic complications and complications during pregnancy – a follow-up study in 68 patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6: 31–35.
- Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: Components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000; 19: 5662–5679.
- Rao AK. Molecular and biochemical basis for the platelet dysfunction in myeloproliferative disorders. *Semin Hematol* 2004; 41: 6–9.

- Raszeja-Specht A, Skibowska A, Bieniaszewska M, Szutowicz A. Relationships between thrombohemorrhagic complications and platelet function in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2001; 68: 32–36.
- Ravandi-Kashani F, Schafer AI. Microvascular disturbances, thrombosis, and bleeding in thrombocythemia: Current concepts and perspectives. *Semin Thromb Haemost* 1997; 23: 479–488.
- Regev A, Stark P, Blickstein D, Lahav M. Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts. *Am J Hematol* 1997; 56: 168–172.
- Regina S, Herault O, D'Alteroche L, Binet C, Gruel Y. JAK2 V617F is specifically associated with idiopathic splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 859–861.
- Remacha AF, Puget G, Nomdedéu JF, Estivill C, Sardà MP, Canals C. Valoración de la mutación V617F del gen JAK2 en síndromes mieloproliferativos crónicos con cromosoma Filadelfia negativo. *Med Clínica (Barc)* 2006; 127: 601–604.
- Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999; 283: 990–993.
- Reilly JT. Pathogenetic insight and prognostic information from standard and molecular cytogenetic studies in the BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Leukemia* 2008; 22: 1818–1827.
- Reverter JC, Tàssies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, Ordinas A. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1319–1326.
- Ridell B, Carneskog J, Wedel H, Vilén L, Høgh Dufva I, Mellqvist UH, Brywe N, Wadenvik H, Kutti J. Incidence of chronic myeloproliferative disorders in the city of Göteborg, Sweden 1983–1992. *Eur J Haematol* 2000; 65: 267–271.

- Rinder HM, Schuster JE, Rinder CS, Wang C, Schweidler HJ, Smith BR. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood* 1998; 91: 1288–1294.
- Rinder HM, Tracey JB, Recht M, DeCastro L, Rinder CS, McHugh C, Smith BR. Differences in platelet  $\alpha$ -granule release between normals and immune thrombocytopenic patients and between young and old platelets. *Thromb Haemost* 1998a; 80: 457–462.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009; 94: 700–711.
- Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med* 2008; 12: 530–538.
- Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, Greaves M. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: Relationships with JAK2 V617F status, clonality and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1679–1685.
- Robinson MSC, Harrison C, Manckie IJ, Machin SJ, Harrison P. Reticulated platelets in primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1988; 101: 388–389.
- Rocca B, Ciabattini G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1225–1230.
- Rodríguez-Liñares B, Watson SP. Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett* 1994; 352: 335–338.
- Rośc D, Krempleska-Nalezyta E, Gadomska G, Zastawna E, Michalski A, Drewniak W. Plasminogen activators (t-PA and u-PA) and plasminogen activators inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in some myeloproliferative syndromes. *Med Sci Monit* 2000; 6: 684–691.

- Rosendaal FR. Venous thrombosis: A multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167–1173.
- Rossi C, Randi ML, Zerbinati P, Rinaldi V, Girolami A. Acute coronary disease in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Intern Med* 1998; 244: 49–53.
- Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* 2005; 280: 27251–27261.
- Rozman C, Giralt M, Feliu E, Rubio D, Cortes MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991; 67: 2658–2663.
- Rozman C, Woessner S, Feliu E, Lafuente R, Berga L. Serie trombocitopoyética. En: Rozman C, Woessner S, Feliu E, Lafuente R, Berga L, editores. *Ultraestructura celular en Hematología*. 2ª Edición. Barcelona: Salvat; 2000. p. 189–235.
- Ruan GR, Jiang B, Li LD, Niu JH, Li JL, Xie M, Qin YZ, Liu YR, Huang XJ, Chen SS. MPL W515L/K mutations in 343 Chinese adults with JAK2V617F mutation-negative chronic myeloproliferative disorders detected by a newly developed RQ-PCR based on TaqMan MGB probes. *Hematol Oncol* 2009; prepublished online as 10.1002/hon.899.
- Rudzki Z, Sacha T, Stoj A, Czekalska S, Wojcik M, Skotnicki AB, Grabowska B, Zduńczyk A, Okoń K, Stachura J. The gain-of-function JAK2 V617F mutation shifts the phenotype of essential thrombocythemia and chronic idiopathic myelofibrosis to more “erythremic” and less “thrombocythemic”: A molecular, histologic, and clinical study. *Int J Hematol* 2007; 86: 130–136.
- Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter C, Pabinger I, Heis N, Castaman G, Missiaglia E, Lechner K, Rodeghiero F. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2002; 71: 1–6.

- Ruggeri M, Rodeghiero F, Toso A, Castamana G, Scognamiglio F, Finazzi G, Delaini F, Micò C, Vannucchi AM, Antonioli E, De Stefano V, Za T, Gugliotta L, Tieghi A, Mazzucconi MG, Santoro C, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) Chronic Myeloproliferative Diseases Working Party. Post-surgery outcomes in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: A retrospective survey. *Blood* 2008; 110: 666–671.
- Rumi E, Passamonti F, Pietra D, Della Porta MG, Arcaini L, Boggi S, Elena C, Boveri E, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer* 2006; 107: 2206–2211.
- Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Familial chronic myeloproliferative disorders: Clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5630–5635.
- Ryning A, Apelseth T, Hausken T, Bruserud Ø. Reticulated platelets are increased in chronic myeloproliferative disorders, pure erythrocytosis, reactive thrombocytosis and prior to hematopoietic reconstitution after intensive chemotherapy. *Platelets* 2006; 17: 296–302.
- Sacher RA, Jacobson RJ, McGill M. Functional and morphological studies of platelet reactivity with vessel wall subendothelium in chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1981; 49: 43–52.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3387–3395.
- Salem HH, van der Weyden MB, Koutts J, Firkin BG. Leg pain and platelet aggregates in thrombocytemic myeloproliferative disease. *JAMA* 1980; 244: 1122–1123.
- Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, Vonderlinden D, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004; 41: 207–232.



- Santilli F, Romano M, Recchiuti A, Dragani A, Falco A, Lessiani G, Fioritoni F, Lattanzio S, Mattoscio D, De Cristofaro R, Rocca B, Davì G. Circulating endothelial progenitor cells and residual in vivo thromboxane biosynthesis in low-dose aspirin-treated polycythemia vera patients. *Blood* 2008; 112: 1085–1090.
- Schafer AI. Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 1982; 306: 381–386.
- Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984; 64: 1–12.
- Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 107: 4214–4222.
- Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing for JAK2-V617F. *Blood* 2009; 113: 2022–2027.
- Scheffer MG, Michiels JJ, Simoons ML, Roeland JRTC. Thrombocythemia and coronary artery disease. *Am Heart J* 1991; 122: 573–576.
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F JAK2 mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 108: 2435–2437.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459–468.
- Sehayek E, Ben-Yosef N, Modan M, Chetrit A, Meytes D. Platelet parameters and aggregation in essential and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 431–436.

- Semeraro N, Cortelazzo S, Colucci M, Barbui T. A hitherto undescribed defect of platelet coagulant activity in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Thromb Res* 1979; 16: 795–802.
- Seubert N, Royer Y, Staerk J, Kubatzky KF, Moucadel V, Krishnakumar S, Smith SO, Constantinescu SN. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell* 2003; 12: 1239–1250.
- Shannon K, Van Etten RA. JAKing up hematopoietic proliferation. *Cancer Cell* 2005; 7: 291–293.
- Shih LY, Lin TL, Dunn P, Wu JH, Tseng CP, Lai CL, Wang PN, Kuo MC. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol* 2001; 29: 202–208.
- Shih LY, Lin TL, Lai CL, Dunn P, Wu JH, Wang PN, Kuo MC, Lee LC. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 100: 1596–1601.
- Shide K, Shimoda HK, Kumano T, Karube K, Kameda T, Takenaka K, Oku S, Abe H, Katayose KS, Kubuki Y, Kusumoto K, Hasuike S, Tahara Y, Nagata K, Matsuda T, Ohshima K, Harada M, Shimoda K. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia* 2008; 22: 87–95.
- Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13: 247–253.
- Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia. *N Engl J Med* 1988; 338: 564–571.

- Silver RT. Imatinib mesylate (Gleevec™) reduces phlebotomy requirements in polycythemia vera. *Leukemia* 2003; 17: 1186–1187.
- Small BM, Bettigole RE. Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of the platelet volume distribution. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 685–691.
- Sozer S, Wang X, Zhang W, Fiel MI, Ishii T, Wang J, Wisch N, Xu M, Hoffman R. Circulating angiogenic monocyte progenitor cells are reduced in JAK2V617F high allele burden myeloproliferative disorders. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 284–291.
- Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009; 113: 5246–5249.
- Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, Ritis K, Korantzis I. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2007; 31: 1053–1062.
- Spivak JL. Polycythemia vera: Myths, mechanisms, and management. *Blood* 2002; 100: 4272–4290.
- Stam J. Thrombosis of the cerebral veins and sinuses. *N Engl J Med* 2005; 352: 1791–1798.
- Stevenson WS, Hoyt R, Bell A, Guipponi M, Juneja S, Grigg AP, Curtis DJ, Scott HS, Szer J, Alexander WS, Tuckfield A, Roberts AW. Genetic heterogeneity of granulocytes for the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythaemia: implications for mutation detection in peripheral blood. *Pathology* 2006; 38: 336–342.
- Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. *CD177*: A member of the *Ly-6* gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Trans Med* 2004; 2: 8.

- Swart SS, Pearson D, Wood JK, Barnett DB. Functional significance of the alpha-2-adrenoreceptor: Studies in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1984; 33: 531–541.
- Taksin AL, Le Couedic JP, Dusanter-Fourt I, Massé A, Giraudier S, Katz A, Wendling F, Vainchenker W, Casadevall N, Debili N. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood* 1999; 93: 125–139.
- Tam CS, Nussenzweig RM, Popat U, Bueso-Ramos CE, Thomas DA, Cortes JA, Champlin RE, Ciurea SE, Manshouri T, Pierce SM, Kantarjian HM, Verstovsek S. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008; 112: 1628–1637.
- Tangun Y. Platelet aggregation and platelet factor 3 activity in myeloproliferative disorders. *Thromb Diath Hemorr* 1971; 25: 241–251.
- Tàssies D, Reverter JC, Cases A, Calls J, Escolar G, Ordinas A. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients: Association with early improvement in platelet function. *Am J Hematol* 1998; 59: 105–109.
- Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 22–28.
- Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004; 103: 3547–3548.
- Tefferi A, Gilliland DG. JAK2 in myeloproliferative disorders is not Just Another Kinase. *Cell Cycle* 2005; 4: 1053–1056.
- Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, Wolanskyj AP, Steensma DP, Mesa R, Gilliland DG. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and

PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005a; 131: 166–171.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110: 1092–1097.

Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj A. The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood* 2007a; 110: 4105.

Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: Before and after Dameshek. *Leukemia* 2008; 22: 3–13.

Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22: 14–22.

Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009; 23: 905–911.

Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4249–4254.

Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; 110: 375–379.

- Thibert V, Bellucci S, Cristofari M, Gluckman E, Legrand C. Increased platelet CD36 constitutes a common marker in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1995; 91: 618–624.
- Tibles HE, Navara CS, Hupke MA, Vassilev AO, Uckun FM. Thrombopoietin induces P-Selectin expression on platelets and subsequent platelet/leukocyte interactions. *Biochem Bioph Res Com* 2002; 292: 987–991.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008; 111: 3931–3940.
- Tomo K, Takayama H, Kaneko Y, Fujita J, Nakamura M, Ueda N, Yamamoto S, Okuma M. Qualitative platelet 12-lipoxygenase abnormality in a patient with essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1997; 77: 294–297.
- Toyama K, Karasawa M, Yamane Arito, Irisawa H, Yokohama A, Saitoh T, Handa H, Matsushima T, Sawamura M, Miyawaki S, Murakami H, Nojima Y, Tsukamoto N. JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: Advantage of studying platelets. *Br J Haematol* 2007; 139: 64–69.
- Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, Terpstra WE, and Falanga A. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2009; 94: 911–918.
- Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004; 32: 179–187.
- Ushikubi F, Okuma M, Ishibashi T, Narumiya S, Uchino H. Deficient elevation of the cytoplasmic calcium ion concentration by epinephrine in epinephrine-insensitive

platelets of patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1990; 33: 96–100.

Valla D, Casadevall N, Huisse MG, Tulliez M, Grange JD, Muller O, Binda T, Varet B, Rueff B, Benhamou JP. Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology* 1988; 94: 1063–1069.

Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia* 2006; 20: 1055–1060.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007; 110: 840–846.

Vannucchi AM, Barbui T. Thrombocytosis and thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007a: 363–370.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W4L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008; 112: 844–847.

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* 2008a; 22: 1299–1307.

Vecino AM, César JM, Navarro JL. Phospholipase A2 activity in platelets of patients with primary thrombocythemia. *Platelets* 2006; 17: 332–335.

- Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Dechanet J, Grosset C, Moreau J-F, Praloran V, Nurden P, Pellegrin J-L, Nurden AT, Ripoche J. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002; 99: 2612–2614.
- Virmani R, Popovsky MA, Roberts WC. Thrombocytosis, coronary thrombosis and acute myocardial infarction. *Am J Med* 1979; 67: 498–506.
- Vizmanos JL, Ormazabal C, Larrayoz MJ, Cross NC, Calasanz MJ. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: A report on a series of 349 patients. *Leukemia* 2006; 20: 534–535.
- Vreeken J, van Aken WG. Spontaneous aggregation of blood platelets as a cause of idiopathic thrombosis and recurrent painful toes and fingers. *Lancet* 1971; 2: 1395–1397.
- Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008; 111: 5271–5281.
- Walsh PN, Murphy S, Barry WE. The role of platelets in the pathogenesis of thrombosis and hemorrhage in patients with thrombocytosis. *Thromb Haemost* 1977; 38: 1085–1096.
- Watson KV, Key N. Vascular complications of essential thrombocythaemia: A link to cardiovascular risk factors. *Br J Haematol* 1993; 83: 198–203.
- Wautier MP, El Nemer W, Gane P, Rain JD, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C, Wautier JL. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood* 2007; 110: 894–901.
- Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alpha IIb beta 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997; 100: 2085–2093.



- Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W. A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol* 1990; 45: 191–197.
- Wehmeier A, Tschöpe D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1991; 61: 271–278.
- Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W. Bleeding and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders—Relation of platelet disorders to clinical aspects of the disease. *Haemostasis* 1989; 19: 251–259.
- Wehmeier A, Südhoff T, Meierkord F. Relation of platelet abnormalities to thrombosis and hemorrhage in chronic myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 391–402.
- Weksler BB, Jaffe EA, Brower MS, Cole OF. Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells. *Blood* 1989; 74: 1627–1634.
- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107: 4274–4281.
- Weyrich AS, Lidemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1897–1905.
- Wiik AS, Paulson OB, Sørensen CM, Visfeldt J. A study of <sup>51</sup>Cr-labelled platelets and the chromosomal pattern in a case of primary haemorrhagic thrombocytopenia. *Acta Haematol* 1971; 46: 177–187.
- Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 2003; 108: 139–145.

- Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2057–2065.
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74: 227–236.
- Wolach B, Gavrieli R, Manor Y, Lishner M. Leukocyte function in chronic myeloproliferative disorders. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 544–551.
- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131: 208–213.
- Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 159–166.
- Wong RSM, Cheng CK, Chan NPH, Cheng SH, Wong WS, Lau KM, Cheng G, Ng MHL. JAK2 V617F mutation is associated with increased risk of thrombosis in Chinese patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2008; 141: 902–904.
- Woodruff RK, Bell WR, Castaldi PA, Streatfield K, Penington DG. Essential thrombocythemia. *Haemostasis* 1980; 9: 105–125.
- Wu KK. Platelet hyperaggregability and thrombosis in patients with thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1978; 88: 7–11.
- Yakubenko VP, Lishko VK, Lam SC-T, Ugarova TP. A molecular basis for integrin  $\alpha_M\beta_2$  ligand binding promiscuity. *J Biol Chem* 2002; 277: 48635–48642.

- Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: Its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81: 1–7.
- Yamamoto K, Sekiguchi E, Takatani O. Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1984; 52: 292–296.
- Zahavi J, Zahavi M, Firsterter E, Frish B, Turleanu R, Rachmani R. An abnormal pattern of multiple platelet function abnormalities and increased thromboxane generation in patients with primary thrombocytosis and thrombotic complications. *Eur J Haematol* 1991; 47: 326–332.
- Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, Patel N, Hu Y, Li S, Van Etten RA. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One* 2006; 1: e18.
- Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Bellosillo B, Solé F. Clonality analysis by *HUMARA* assay in Spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Haematologica* 2005; 90: 259–261.
- Zeidman A, Horowitz A, Kanter P, Stein GY, Redlich O, Cohen A, Mittelman M. Platelet function and its clinical significance in the myeloproliferative disorders. *Haema* 2005; 8: 64–69.
- Zeigler Z, Murphy S, Gardner FH. Microscopic platelet size and morphology in various hematologic disorders. *Blood* 1978; 51: 479–486.
- Zhang L, Zhao H, Sun A, Lu S, Liu B, Tang F, Feng Y, Zhao L, Yang R, Han ZC. Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34+ bone marrow cells in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004; 89: 1199–1206.

- Zhang S, Qiu H, Fischer B, Li W, Duan L, Sun X, Xu W, Li J. JAK2 V617F patients with essential thrombocythemia present with clinical features of polycythemia vera. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 696–699.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280: 22788–22792.
- Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: Measuring the uncertain. *Haematologica* 2008; 93: 1412–1414.
- Zucker S, Mielke CH. Classification of thrombocytosis based on platelet function tests: Correlation with hemorrhagic and thrombotic complications. *J Lab Clin Med* 1972; 80: 385–394.
- Xing S, Wanting TH, Zhao W, Ma J, Wang S, Xu X, Li Q, Fu X, Xu M, Zhao ZJ. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood* 2008; 111: 5109–5117.