

**Papel de la activación leucocitaria y plaquetaria en la trombosis
de los síndromes mieloproliferativos crónicos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Alberto Álvarez Larrán

Director de tesis:

Francisco Cervantes Requena

Facultad de Medicina
Universitat de Barcelona

A Mar, Sara e Iria

A mis padres

ÍNDICE

Agradecimientos

0. Abreviaturas.....	9
1. Introducción.....	11
1.1. Policitemia vera.....	11
1.1.1. Etiopatogenia.....	11
1.1.2. Patogenia de la trombosis en la PV.....	20
1.1.3. Complicaciones trombóticas de la PV.....	29
1.2. Mielofibrosis primaria.....	41
1.2.1. Etiopatogenia de la MFP.....	41
1.2.1.1. Papel de la hemopoyesis clonal	42
1.2.1.2. Fisiopatología de la de la hemopoyesis extramedular.....	47
1.2.1.3. Papel de los factores de crecimiento y las citocinas.....	48
1.2.2. Manifestaciones clínicas.....	55
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	61
3. Resultados.....	63
3.1. Trabajo 1. Sobreexpresión del antígeno CD11b granulocitario en el síndrome de Budd-Chiari y la trombosis portal secundarios a policitemia vera.....	65
3.1.1. Resumen.....	67
3.1.2. Copia del artículo	
3.2. Trabajo 2. Incidencia de trombosis y factores de riesgo para esta complicación en la mielofibrosis primaria: análisis de una serie de 155 pacientes procedentes de una sola institución.....	69
3.2.1. Resumen.....	71

3.2.2. Copia del artículo.....	
3.3. Trabajo 3. Aumento de la activación plaquetaria, leucocitaria y de la coagulación en la mielofibrosis primaria.....	73
3.3.1. Resumen.....	75
3.3.2. Copia del artículo.....	
4. Discusión.....	77
4.1. Sobreexpresión del antígeno CD11b granulocitario en el síndrome de Budd-Chiari y la trombosis portal secundarios a policitemia vera.....	77
4.2. Incidencia de trombosis y factores de riesgo para esta complicación en la mielofibrosis primaria: análisis de una serie de 155 pacientes de una sola institución.....	83
4.3. Aumento de la activación plaquetaria, leucocitaria y de la coagulación en la mielofibrosis primaria.....	89
5. Conclusiones.....	93
6. Bibliografía.....	95

AGRADECIMIENTOS

A Paco Cervantes, por ser la persona que ha orientado y dirigido tanto mi formación como mi trayectoria médica y científica en un entorno de amistad, rigurosidad y perfeccionismo.

A Arturo Pereira, por haber sido la persona que me introdujo en el mundo del laboratorio. Una experiencia que posteriormente se tornaría crucial para que en la presente tesis se pudiesen estudiar los mecanismos de trombosis en los síndromes mieloproliferativos crónicos.

A Carles Besses, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en el área de los síndromes mieloproliferativos crónicos.

A los médicos del servicio de Hematología del Hospital Clínic, cuyas enseñanzas y buen hacer fueron la base de mi formación como hematólogo.

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

A todas aquellas personas que, a pesar de trabajar en una condición de precariedad laboral ponen, día a día, lo mejor de sí mismos.

0. ABREVIATURAS

ADP: adenosín difosfato

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico

c-MPL: receptor de la trombopoyetina

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EPO: eritropoyetina

F1+2: fragmento 1 + 2 de la protrombina

G-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas

GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas

ICAM-1: molécula 1 de adhesión intercelular

JAK2: Janus cinasa de tipo 2

LPS: lipopolisacárido

MFP: mielofibrosis primaria

PAI-1: inhibidor del plasminógeno activado de tipo 1

PV: policitemia vera

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

SBC: síndrome de Budd-Chiari

SCF: stem cell factor

SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico

TE: trombocitemia esencial

TGF- β : factor transformante de fibroblastos beta

TM: trombomodulina

TP: trombosis del eje espleno-portal

TPO: trombopoyetina

MFI: intensidad media de fluorescencia

MESF: moléculas equivalentes de fluorocromo soluble

VEGF: factor de crecimiento vascular y endotelial

1. INTRODUCCIÓN

Bajo el término síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Filadelfia-negativos (SMPC) “clásicos” se incluyen tres entidades: la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP). Se trata de proliferaciones clonales que se originan en una célula madre pluripotencial común a las tres series hemopoyéticas(1), que comparten ciertas características clínicas y biológicas, como son la presencia de una médula ósea hiper celular, una incidencia aumentada de complicaciones trombóticas y hemorrágicas y, a largo plazo, un riesgo aumentado de evolución a leucemia aguda. En este sentido, el reciente descubrimiento de la mutación V617F del gen JAK2 en el 95% de los pacientes con PV y en la mitad de los casos de TE y MFP ha venido a apoyar la agrupación de esta tres entidades en una posición nosológica común (2-6). El aumento de la masa eritrocitaria en la PV, la trombocitosis en la TE y la fibrosis medular en la MFP son, respectivamente, las características fundamentales de cada una de estas tres entidades.

1.1 Policitemia vera

1.1.1 Etiopatogenia de la policitemia vera

La policitemia vera fue descrita por primera vez en el año 1892 por Vaquez, quien denominó a dicha entidad “cianosis con poliglobulia persistente”, creyendo que era la consecuencia de una enfermedad cardíaca congénita, aunque también consideró la posibilidad de que existiese una alteración vital de los órganos hemopoyéticos. En una famosa editorial titulada “Some

Speculations on the Myeloproliferative Syndromes”, escrita por Dameshek en 1951, se sugirió que la PV, la TE, la MFP y la LMC eran entidades muy próximas entre sí, en las que había un incremento en la proliferación de células mieloides, debido probablemente a una alteración desconocida que estimulaba dicha proliferación (7). En aquel momento se especulaba con la posibilidad de que un esteroide u otra hormona pudiera actuar como factor estimulador de la mielopoyesis. Veinte años después, en 1974, se describió que los progenitores eritroides de la médula ósea de pacientes con PV podían cultivarse *in vitro* en ausencia de eritropoyetina (8), hallazgo que contrastaba con el hecho de que en individuos normales el crecimiento de progenitores hemopoyéticos se producía únicamente en presencia de factores de crecimiento. Dicho descubrimiento supuso un importante cambio en el concepto que se tenía de esta enfermedad, ya que la existencia de un crecimiento autónomo de los progenitores eritroides descartaba la posibilidad de que la PV fuese la consecuencia de un exceso de factor de crecimiento exógeno, sugiriendo más bien un comportamiento neoplásico y, por tanto, un origen clonal de la enfermedad. Dicho origen clonal se confirmó a partir del estudio de los patrones de inactivación del cromosoma X en mujeres con PV (1,9). En el sexo femenino sólo uno de los dos cromosomas X está activo, mientras que el otro se inactiva en fases muy precoces de la embriogénesis. Esta inactivación se produce en cada célula al azar y se mantiene en las subsiguientes progenies aunque la célula se transforme en neoplásica. El hallazgo de patrones clonales en mujeres con PV al estudiar una variante polimórfica del gen de la G6PD (esto es, que las células proliferantes presentaban todas ellas el mismo tipo de isoenzima) sugería que la PV se originaba a partir de un progenitor

hemopoyético clonal (1). Sin embargo, los genes implicados en la etiopatogenia de la PV permanecieron ocultos hasta muy recientemente, cuando Kralovics et al (10) refirieron que el 33% de los pacientes con PV presentaban una pérdida de la heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 9, debido a un mecanismo de recombinación mitótica, por tanto, no reconocible en el estudio citogenético convencional. Dicho hallazgo reforzaba el origen clonal de la PV y señalaba al brazo corto del cromosoma 9 como el lugar donde se encontraba el gen causal de la PV. Finalmente, en el año 2005 cinco grupos independientes demostraron de forma simultánea que la mayoría de pacientes con PV presentaba una mutación puntual localizada en el gen de la cinasa JAK2, localizado en el brazo corto del citado cromosoma 9 (2-6).

Tabla 1: Secuencia histórica de las principales aportaciones científicas en la PV

Autor	Año	Hallazgo
Vaquez	1892	Primer paciente catalogado de PV
Damesheck	1951	Concepto de SMPC
Prchal	1974	Crecimiento endógeno de colonias eritroides
Adamson	1976	Hemopoyesis clonal
Kralovics	2002	Pérdida heterocigosidad 9p
Baxter, James, Kralovics, Levine, Zhao	2005	Mutación V617F del gen JAK2
Scott	2007	Mutaciones en el exón 12 del gen JAK2

JAK2 es una proteína citoplasmática con actividad tirosinocinasa que desempeña un papel crucial en la transmisión al interior de la célula (11,12) de señales desde los receptores de citocinas tipo I, entre los que se encuentran los receptores de la eritropoyetina, el G-CSF, el GM-CSF o la trombopoyetina (c-MPL). La importancia de JAK2 en la hemopoyesis se puso de manifiesto en un modelo con ratones *knock-out* a los que se les eliminó dicho gen. Estos ratones presentaron una ausencia total de progenitores eritropoyéticos y todos ellos murieron en el día 12 del desarrollo embrionario (13,14). Cabe destacar que la proteína JAK2 se une al receptor de la eritropoyetina en el retículo endoplasmático, siendo su presencia imprescindible tanto para el correcto procesamiento del receptor en el aparato de Golgi como para su posterior expresión en la superficie celular (15).

En condiciones normales, al unirse la eritropoyetina al receptor, éste 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 (16-19). Una vez activada JAK2, recluta a las proteínas STAT, que se fosforilan y dimerizan, entrando en el núcleo, donde activan la transcripción de genes implicados en la proliferación y la supervivencia (11,12).

La mutación V617F de JAK2 es una mutación puntual que afecta al nucleótido 1849 y que provoca un cambio de una guanina por una timidina (G>T). Como consecuencia, se produce un cambio en la proteína final, en la que el aminoácido 617, en lugar de ser una valina, es una fenilalanina. La mutación V617F afecta a un aminoácido situado en el dominio JH2. Dicho

dominio tiene actividad pseudocinasa y su función consiste en inhibir al dominio cinasa JH1 interaccionando con el bucle de activación (20). Como consecuencia de la mutación V617F no se produce la inhibición del dominio cinasa JH1, lo que resulta en una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando al receptor hemopoyético. Se trata, por tanto, de una mutación que provoca una ganancia de función, es decir, una activación permanente de diferentes vías de transducción de señales implicadas en la señalización de los receptores de citocinas de tipo I (EPO, G-CSF, c-MPL) como JAK-STAT, PI3K , AKT, MAPK y ERK (3-6,21-23).

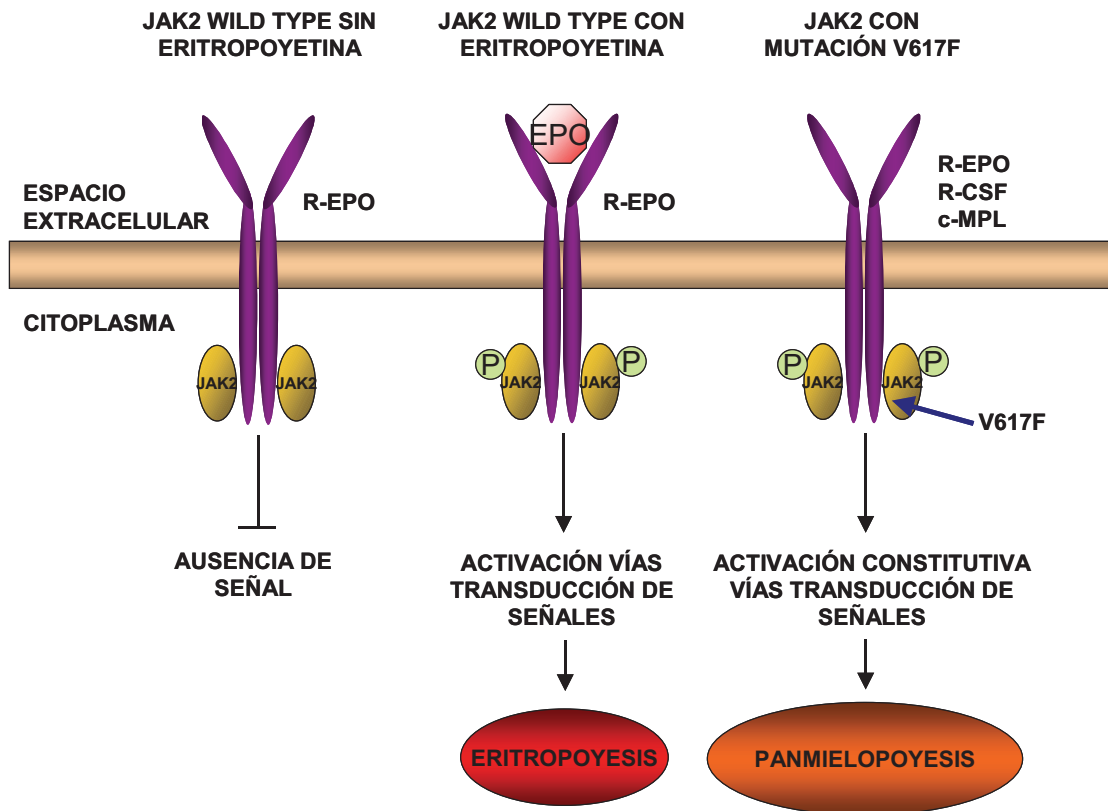


Figura 1: Mecanismo de acción de JAK2. En condiciones normales cuando el receptor de la eritropoyetina (R-EPO) no está unido a su ligando la proteína JAK2 permanece desfosforilada, sin que se transmita ninguna señal al interior celular. Tras la unión con la eritropoyetina, el R-EPO se activa y se produce la fosforilación de JAK2, la cual, a su vez, fosforila diferentes proteínas que intervienen en la transmisión de señales al interior celular, lo que resulta en un estímulo de la eritropoyesis. Cuando la proteína JAK2 alberga la mutación V617F, permanece fosforilada en ausencia de ligando, 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 la EPO, el G-CSF y la TPO.

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 eritrocitosis y leucocitosis (3,24-26). 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 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 la PV.

La mutación V617F de JAK2 se ha detectado tanto en progenitores hemopoyéticos obtenidos de cultivos de colonias eritroides in vitro (2,27,27) como en células CD34+ aisladas mediante *sorting* (28,29), lo cual indica que la PV tiene su origen en una célula madre hemopoyética multipotente. Este hallazgo explicaría la frecuente existencia de leucocitosis y trombocitosis en la PV, de tal modo que la mutación V617F de JAK2 no sólo se restringe a la vía de la eritropoyetina sino que también estaría involucrada en la transmisión de señales a través de las vías de la trombopoyetina y el G-CSF, actuando así en la diferenciación de las series eritroide, granulocítica y megacariocítica.

Algunos trabajos recientemente publicados han sugerido que, además de JAK2, existirían otras mutaciones que intervendrían en la génesis de la PV y que incluso la precederían. En este sentido, cabe destacar que en torno al 5-10% de pacientes con PV tienen deleciones de 20q u otras alteraciones citogenéticas (30). Además, se ha descrito el caso de un paciente con PV en el

que era mayor la proporción de granulocitos con la delección de 20q que la de los que tenían la mutación V617F de JAK2 (31), sugiriendo, por tanto, que la delección de 20q habría precedido a la adquisición de la citada mutación. Por otro lado, la coexistencia constante de la delección de 20q y la mutación de JAK2 sugiere que en dicho cromosoma podría existir un gen cooperador para el desarrollo de la PV (32). Otro aspecto que indicaría que podría haber otros mecanismos involucrados en la génesis de la PV es 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 (31,32). Algunos autores han interpretado dicha observación como una evidencia a favor de una proliferación clonal que precedería a la adquisición de la mutación V617F de JAK2. En la misma línea, se han descrito pacientes con PV JAK2 positiva en los que, cuando la enfermedad evolucionó a leucemia aguda, las células leucémicas eran JAK2 negativas (32), lo cual sería, una vez más, compatible con un origen de la leucemia a partir de un clon que precedía a la mutación de JAK2. Por último, en casos familiares de síndromes mieloproliferativos, se ha demostrado que la mutación de JAK2 es adquirida (33), pareciendo, por tanto, que la predisposición heredada sería independiente de JAK2. Todos estos hallazgos vendrían a apoyar la existencia de otros genes involucrados en la génesis y la progresión de la PV, además de la mutación V617F de JAK2, si bien por el momento dichas alteraciones moleculares son desconocidas.

La homocigosidad de la mutación V617F de JAK2 desempeña un papel importante en la PV. La pérdida de heterocigosidad se produce por recombinación mitótica, localizándose los puntos de ruptura de forma dispersa

a lo largo del brazo corto del cromosoma 9, entre el locus de JAK2 y el centrómero (4), lo cual implica que no hay un único lugar frágil de ruptura que facilite el proceso de recombinación. En la PV el porcentaje de células sanguíneas que albergan la mutación aumenta con el tiempo (27), probablemente debido a la ventaja proliferativa de los progenitores mutados. 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 (34). Ello puede reflejar el efecto dosis producido por la presencia de una carga alélica doble, a lo que probablemente habría que añadir la pérdida de inhibición ejercida por los alelos normales (3).

La homocigosidad para la mutación V617F se detecta en el 30% de los granulocitos de los pacientes con PV (2-5). Sin embargo, cuando se estudian progenitores obtenidos a partir de cultivos de los mismos pacientes, en torno al 90% de los pacientes son homocigotos, hallazgo que no se ha observado en la TE (27). Esta diferencia sugiere que la homocigosidad de la mutación promovería el desarrollo de la PV. Los factores genéticos o ambientales que podrían promover la recombinación mitótica y, por tanto, facilitar el desarrollo de un síndrome mieloproliferativo de tipo PV no se conocen, pero podrían explicar por qué la misma mutación en unos pacientes da lugar a una PV y en otros a la TE.

La presencia de la mutación V617F puede detectarse en sangre total, granulocitos, plaquetas, preparaciones de médula ósea e incluso en biopsias de médula ósea (siempre y cuando éstas no hayan sido procesadas con reactivos que contengan mercurio). Asimismo puede detectarse en progenitores hemopoyéticos obtenidos por cultivos celulares *in vitro*.

Se pueden aplicar diferentes técnicas para detectar la presencia de la mutación de JAK2. De entre las técnicas disponibles, una de las que tiene una mayor sensibilidad es la PCR-aleloespecífica cuantitativa. La prevalencia de la mutación V617F en la PV es superior al 90%, mientras que en la trombocitemia esencial y en la mielofibrosis primaria es del 50%. El descubrimiento de la mutación V617F del gen JAK2 ha tenido un impacto importante en la práctica clínica, ya que permite establecer fácilmente el diagnóstico de un SMPC (35). Sin embargo, para determinar el tipo de SMPC es necesario tener en cuenta los resultados del hemograma y los hallazgos de la biopsia de médula ósea (35).

Recientemente se ha descrito que los casos de PV y eritrocitosis idiopática negativos para la mutación V617F de JAK2V pueden presentar mutaciones en el exón 12 de JAK2 (36-39) (el aminoácido 617 se encuentra en el exón 14). Estas mutaciones no se localizan en un nucleótido concreto, como es el caso de la mutación V617F, sino que pueden afectar a diferentes nucleótidos y, en consecuencia, a diferentes aminoácidos localizados en este exón, concretamente entre los aminoácidos 538 y 543. Las mutaciones en el exón 12 no se han descrito en casos de TE o de PMF negativos para la mutación V617F y parecen asociarse a un fenotipo más eritroide. Se ha descrito que los casos de PV que presentan mutaciones en el exón 12 presentan valores más altos de hemoglobina en el momento del diagnóstico que los casos de PV V617F positiva, así como valores de leucocitos y de plaquetas normales (36-40).

1.1.2 Patogenia de la trombosis en la PV

La trombosis constituye la principal causa de mortalidad y morbilidad en la PV (41,42). El aumento en la incidencia de trombosis se ha atribuido clásicamente a la expansión de la masa eritrocitaria que caracteriza a la enfermedad (43). No obstante, también se cree que la trombocitosis y la leucocitosis existente en estos pacientes, así como las alteraciones funcionales de las plaquetas y los neutrófilos, podrían desempeñar un papel en la aparición de la trombosis (44-48).

Tabla 2. Principales factores involucrados en la patogenia de la trombosis en la PV

<p>1. Factores independientes del SMPC</p> <ul style="list-style-type: none">- Edad- Factores de riesgo cardiovascular- Alteraciones primarias de la coagulación
<p>2. Factores dependientes del SMPC</p> <ul style="list-style-type: none">- Masa eritrocitaria aumentada- Trombocitosis- Alteraciones funcionales de las plaquetas- Leucocitosis- Activación leucocitaria- Interacción leucocito-plaqueta

La aparición de trombosis en la PV aumenta con la edad, sobre todo en aquellos pacientes que tienen un antecedente previo de trombosis (42). Por tanto, la coexistencia de una enfermedad vascular parece tener un papel importante en la aparición de trombosis en los pacientes con PV. Sin embargo, también existe un aumento de la frecuencia de complicaciones trombóticas en pacientes jóvenes con PV (49). Así, en una serie de 58 pacientes diagnosticados de PV con una edad inferior a 40 años la trombosis fue la principal causa de muerte (49). Estos datos sugieren que, además de la aterosclerosis, existen otros factores dependientes exclusivamente de la enfermedad que intervienen en la patogenia de la trombosis de la PV.

La principal alteración hemorreológica en la PV es el aumento de la viscosidad sanguínea (50-52). Pearson y Wetherley-Mein demostraron una fuerte correlación entre el valor de hematócrito y la aparición de complicaciones trombóticas, sobre todo en el sistema nervioso central (SNC) (43). Por otro lado, Thomas et al (52) demostraron que el flujo sanguíneo cerebral está reducido en los pacientes con PV cuando el hematócrito es superior a 0,53 L/L y que dicha alteración persiste incluso cuando el hematócrito se mantiene en los límites altos de la normalidad. La reducción del hematócrito mediante la realización de sangrías terapéuticas se traduce en una disminución de la viscosidad sanguínea y en un aumento del flujo sanguíneo cerebral. Sin embargo, en algunos pacientes con PV la normalización del hematócrito no se acompaña de una normalización de la viscosidad sanguínea, lo cual sugiere que el hematócrito no es el único factor que contribuye al aumento de la viscosidad sanguínea en la PV (50).

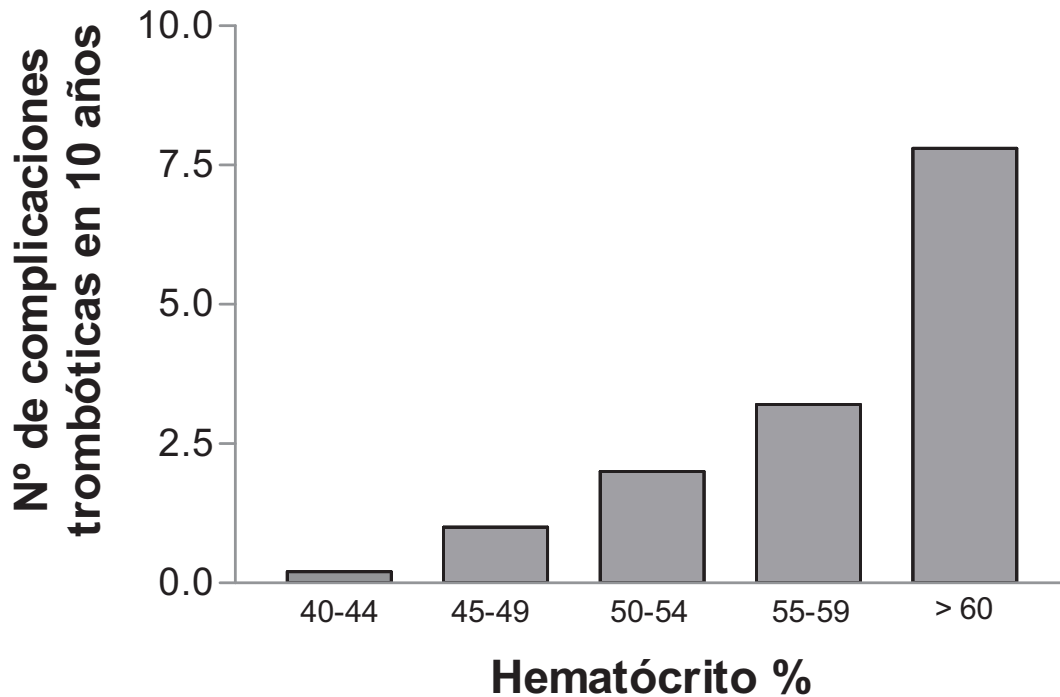


Figura 2: Papel del hematócrito en la trombosis de la PV. Adaptado de Pearson y Wetherley-Mein.

Existen numerosas interpretaciones para explicar el papel del hematócrito en la aparición de trombosis. Turitto y Weiss (51) demostraron que la adhesión plaquetaria y la formación del trombo en el subendotelio dependen en parte de la frecuencia con que las plaquetas contactan con la superficie vascular. En un estado policitémico, en el que el número de glóbulos rojos está aumentado, se produce un mayor número de colisiones entre eritrocitos y plaquetas, lo que da lugar a un incremento en el número de plaquetas que se desplazan de forma perpendicular al flujo sanguíneo. Este desplazamiento de las plaquetas desde el interior hacia la pared vascular podría tener un papel importante en el desarrollo de la trombosis (51). Una explicación alternativa para la asociación entre nivel de hematócrito y trombosis se basa en el

conocimiento de la relación existente entre hematócrito y viscosidad sanguínea (53). El aumento del hematócrito produce un aumento de la viscosidad sanguínea que, a su vez, da lugar a un aumento en la resistencia vascular periférica. Como consecuencia, el flujo sanguíneo disminuye en algunos órganos, como el SNC, predisponiéndolos al desarrollo de trombosis.

Los pacientes con hemoglobinopatías en las que existe una mayor afinidad por el oxígeno presentan constantemente una eritrocitosis secundaria que suele cursar con un hematócrito y una masa eritrocitaria similares a los observados en la PV. Sin embargo, en estos pacientes no se ha documentado un aumento en la incidencia de complicaciones trombóticas, lo cual sugiere que en la PV, además del aumento del hematócrito, deben coexistir otros mecanismos involucrados en la aparición de la trombosis.

La trombocitosis y las anomalías en el funcionalismo plaquetario son hallazgos frecuentes en la PV, de tal forma que es probable que estas alteraciones desempeñen algún papel en la patogenia de la trombosis (54-60). Dawson y Ogston (55) refirieron la asociación entre trombocitosis y trombosis. Sin embargo, este hallazgo no se confirmó en otros estudios (41,57,61). Cabe destacar que en la PV se ha descrito un aumento en la producción de tromboxano plasmático y de la activación plaquetaria (58). Además, un estudio aleatorizado ha mostrado que la aspirina a dosis bajas es eficaz en la prevención de la aparición de complicaciones trombóticas en la PV (62). Dicho efecto se ha atribuido a la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria y la consiguiente disminución de la producción de tromboxano A₂. Por otro lado, en la PV la eritromelalgia no se resuelve con flebotomías o administrando únicamente tratamiento anticoagulante, sino que es necesario instaurar

tratamiento antiagregante o reducir la cifra de plaquetas con fármacos citorreductores (59). Finalmente, cabe destacar que en la TE diferentes estudios han demostrado que el control de la cifra de plaquetas se correlaciona con una disminución en el riesgo de trombosis (54,63)

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 PV (42,43,55,57,61), todos los hallazgos anteriormente citados sugieren que las plaquetas probablemente desempeñen un papel en la génesis de la trombosis.

En torno al 50-60% de los pacientes con PV presenta leucocitosis moderada. Se ha sugerido que dicha leucocitosis podría empeorar las propiedades reológicas de la sangre en la microcirculación. Además, en el estudio ECLAP, en el que se analizaron los diferentes factores asociados a un mayor riesgo de trombosis en 1638 pacientes afectados de PV, la leucocitosis resultó ser un factor de riesgo independiente en el análisis multivariado (48). Los leucocitos activados pueden liberar proteasas y radicales libres que, a su vez, pueden alterar el estado funcional de las plaquetas o dañar el endotelio, induciendo por tanto un estado protrombótico. 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 (64). 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 trombosmodulina. 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 (65).

Falanga et al (44) 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 ciertos marcadores plasmáticos de hipercoagulabilidad, en concreto, el complejo trombina-antitrombina, el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) y el dímero-D. Dichos resultados se añadían a estudios previos que habían puesto de manifiesto la existencia de un fenotipo activado en los neutrófilos y los monocitos de los pacientes con PV (66). Se ha estudiado asimismo la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos, si bien los resultados han sido contradictorios (67-69). Sin embargo, en estos estudios no se determinó si existían diferencias en dichos parámetros de activación entre los pacientes con y sin antecedente de trombosis.

Por otra parte, existe una evidencia cada vez mayor de que las plaquetas pueden iniciar y propagar procesos inflamatorios y trombóticos a través de su interacción con los granulocitos. 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 (70). 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. 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 (71).

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 (71,72). La P-selectina es una proteína que se expresa de forma constitutiva en la membrana interna de los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel Palade del endotelio y se trasloca rápidamente a la superficie tras la activación (73,74). 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 (73-77). La P-selectina es considerada un agonista de la activación leucocitaria. Una vez expresada en la superficie celular, se une a su contrarreceptor (PSGL-1), el cual se expresa de manera constitutiva sobre la superficie leucocitaria, induciendo la transducción de la activación leucocitaria. 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 (78). La importancia del efecto de la P-selectina sobre los leucocitos, en particular sobre los neutrófilos y monocitos, aumentó al observarse que la P-selectina expresada sobre las plaquetas activadas ejercía el mismo efecto que la presente en el endotelio inflamado

(72,79). En estas condiciones, los leucocitos circularían activados, expresando un fenotipo protrombótico.

Maugeri et al, en un estudio realizado en pacientes con PV y TE, demostraron que la expresión de P-selectina y los complejos leucocito-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 PSGL-1 (77,80). Jensen et al 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 (81,82). Por su parte, Falanga et al reportaron recientemente la existencia de un elevado porcentaje de complejos leucocito-plaqueta en los pacientes con TE y PV, así como que la presencia de dichos agregados mixtos 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 (46). Recientemente, el mismo grupo estudió la relación existente entre los diferentes parámetros de activación leucocitaria y plaquetaria y la presencia de la mutación V617F de JAK2 en 38 pacientes afectados de TE, observando que los pacientes con la mutación presentaban un mayor porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes (83). Por último, nuestro grupo estudió la activación plaquetaria, la activación leucocitaria y los complejos leucocito-plaqueta en dos cohortes de pacientes con TE, con y sin antecedente de trombosis, y en un grupo control constituido por donantes de

sangre (84). En este último estudio, los pacientes con TE presentaron un aumento en todos los parámetros estudiados de activación, así como en el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes cuando se comparaban con los valores obtenidos en donantes sanos (84). Pero, además, los pacientes con TE y trombosis presentaron un mayor porcentaje de plaquetas que expresaban P-selectina, tanto en condiciones basales como tras estimulación con ácido araquidónico, así como una mayor expresión de CD11b y factor tisular monocitario que los pacientes con TE sin trombosis (84). Dichos hallazgos sugieren que en la TE tanto la activación plaquetaria como la leucocitaria, fundamentalmente la monocitaria, están involucradas en la génesis de la trombosis. Además, los pacientes con TE y mutación de JAK2 tenían una mayor expresión de P-selectina plaquetaria basal y tras estimulación con ácido araquidónico, lo cual, a su vez, sugiere que la activación plaquetaria en la TE depende de la presencia de la mutación V617F de JAK2 (84). Si tenemos en cuenta que la mayoría de pacientes con PV presentan la mutación de JAK2, estos hallazgos indicarían que tanto la activación plaquetaria como la leucocitaria podrían desempeñar un papel relevante en la patogenia de la trombosis de los pacientes con PV.

1.1.3. Complicaciones trombóticas de la PV

Actualmente, como consecuencia de la realización de analíticas de escrutinio en la población general, una importante proporción de enfermos con PV se diagnostica antes de que la enfermedad haya producido síntomas. Los pacientes sintomáticos en el momento del diagnóstico pueden presentar cefalea, prurito, alteraciones visuales, parestesias, síntomas articulares y

pérdida de peso (85). Además, es frecuente que la trombosis sea una de las manifestaciones iniciales de la PV. Así, en un estudio prospectivo se registró que el 14% de los pacientes tenían antecedente de trombosis en los años previos al diagnóstico de la PV, mientras que en el 20% de los casos la trombosis fue la manifestación inicial de la enfermedad (42).

Las complicaciones trombóticas constituyen la principal causa de muerte en la PV. Por ello, el objetivo fundamental del tratamiento es reducir la frecuencia de dichas complicaciones. La trombosis es la causa de la muerte en un 30-45% de los pacientes (42,86), mientras que la transformación a leucemia aguda y las segundas neoplasias suponen el 13% y el 19,5% de los fallecimientos, respectivamente (86,87).

En la tabla 3 se muestra la frecuencia de trombosis en el momento del diagnóstico o a lo largo de la evolución de la enfermedad en tres de las series más amplias publicadas de PV. Como se puede ver, la frecuencia de trombosis en el momento del diagnóstico (previa o simultánea) osciló entre el 34% y el 39%, mientras que la trombosis a lo largo de la evolución fue del 13-19%.

Tabla 3: Complicaciones trombóticas iniciales y evolutivas en tres series de pacientes con PV

Autor	Número de pacientes	Trombosis inicial (%)	Trombosis durante el seguimiento (%)
GISP, 1995 (42)	1213	34	19
Passamonti, 2000 (88)	163	34	18
Marchioli, 2005 (86)	1638	39	13

Entre las trombosis que aparecen tras el diagnóstico de la PV, la arterial es el tipo más frecuente y supone el 81% de las muertes de causa trombótica. En la tabla 4 se muestran los tipos de complicaciones trombóticas registradas durante el seguimiento de 1213 pacientes afectados de PV en la serie del *Gruppo Italiano Studio Policitemia* (42). Como puede verse, dentro de las trombosis arteriales, la cardiopatía isquémica y la enfermedad vascular cerebral fueron las complicaciones más frecuentes, pero también fueron habituales las trombosis venosas profundas, el tromboembolismo pulmonar y la vasculopatía periférica (42,89). Además, no es inusual la aparición de trombosis en territorios poco habituales, como las arterias suprahepáticas, las venas del eje espleno-portal o los senos venosos cerebrales.

Tabla 4: Complicaciones trombóticas durante el seguimiento de 1213 pacientes afectados de PV(42)

Tipo de trombosis	No fatal, n (%)	Fatal, n (%)
Trombosis arterial	101 (50,5)	44 (81,5)
IAM	28 (14)	27 (50)
AVC	19 (9,5)	17 (31,5)
AIT	39 (19,5)	-
Vasculopatía periférica	15 (7,5)	-
TVP-TEP	77 (38,5)	10 (18,5)
TVP	35 (17,5)	-
Tromboflebitis	37 (18,5)	-
Desconocido	27 (13,5)	-
Total	200 (100)	54 (100)

IAM: infarto agudo de miocardio. AVC: accidente vascular cerebral. AIT: ataque isquémico transitorio. TVP-TEP: trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar. TVP: trombosis venosa profunda

En torno a un 60-80% de los pacientes con PV no tratados presentan manifestaciones neurológicas, entre las cuales destacan los AIT y el infarto cerebral (42,43,90,91). Además, es frecuente que los pacientes refieran cefalea, tinnitus o alteraciones visuales, las cuales se atribuyen al aumento de la viscosidad sanguínea y la consiguiente reducción en el flujo sanguíneo cerebral(42,43). Los accidentes vasculares cerebrales (AVC) son más frecuentes en la PV que en la población general (60,90,92) .

La vasculopatía periférica es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la PV y puede manifestarse como eritromelalgia, isquemia digital con pulsos palpables o claudicación intermitente (93-95). La eritromelalgia se caracteriza por la aparición de episodios de dolor quemante en los dedos, junto a una sensación de calor que se alivia con el frío(59). La PV es la causa más frecuente de eritromelalgia y ésta es una consecuencia de la activación y agregación plaquetaria que ocurre *in vivo* al nivel de las arteriolas. Dicha agregación se ha atribuido a la alteración en el metabolismo del ácido araquidónico que existe en las plaquetas de los pacientes con PV (59). Sin tratamiento la eritromelalgia puede producir cianosis de las partes acras e incluso gangrena. Cabe destacar que las sangrías terapéuticas no mejoran la eritromelalgia (59,96,97). Sin embargo, el empleo de antiagregantes o la reducción de la cifra de plaquetas con tratamiento citolítico consiguen controlar dicha sintomatología.

No es raro que los pacientes con PV desarrollen trombosis en territorios anatómicos atípicos, siendo relativamente frecuentes las trombosis del eje espleno-portal. El síndrome de Budd-Chiari es una de las complicaciones trombóticas más graves de la PV y se produce como consecuencia de la oclusión trombótica de las arterias suprahepáticas que drenan la sangre del hígado a la vena cava inferior. Dicho síndrome se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, ictericia, hepato-esplenomegalia y el desarrollo de complicaciones secundarias a la presencia de hipertensión portal, tales como la ascitis o la hemorragia digestiva por varices esofágicas (98).

La PV es una de las principales causas de síndrome de Budd-Chiari. En este sentido, se ha referido que entre un 10% y un 40% de los casos de

síndrome de Budd-Chiari están asociados a la PV (98,99). Por ello, cuando se diagnostica esta complicación debe ponerse en marcha un estudio exhaustivo con la finalidad de descartar la presencia de una PV u otro SMPC. En estos pacientes, la presencia de leucocitosis, trombocitosis o esplenomegalia puede orientar hacia un SMPC. Sin embargo, cabe descartar que los pacientes con PV y trombosis portal o SBC pueden presentar cifras de hemoglobina y hematócrito normales. La medición de la masa eritrocitaria es la prueba fundamental para establecer el diagnóstico de la PV, pero en estos casos el sangrado digestivo por varices esofágicas puede alterar el resultado de dicha prueba (100). Por ello, antes del descubrimiento de la mutación V617F de JAK2, en este subgrupo de pacientes el diagnóstico del SMPC se basaba fundamentalmente en los hallazgos de la biopsia de médula ósea y en la presencia de crecimiento endógeno de colonias eritroides (101-103).

Los SMPC son la causa más frecuente del síndrome de Budd-Chiari (SBC) y están presentes en una importante proporción de pacientes con trombosis del eje espleno-portal (TP) (103-107). Así, Denninger et al 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 SMPC concomitante, basándose el diagnóstico del SMPC 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 (104). Es importante destacar que más del 50% de los casos de esta serie correspondían a formas frustres de SMPC, es decir, que el diagnóstico se sustentaba tan sólo en la existencia de crecimiento endógeno de colonias eritroides. Tras el descubrimiento de la mutación V617F del gen JAK2

han aparecido diversos estudios en los que se analiza la prevalencia de dicha mutación en los pacientes con SBC y TP (tabla 5) (107-111).

Tabla 5: Principales estudios en los que se analiza la prevalencia de la mutación V617F de JAK2 en pacientes con síndrome de Budd-Chiari y trombosis del eje espleno-portal

Autor	Número de pacientes	Mutación V617F de JAK2 (%)
Kiladjian (107)	SBC: 104	45
	TP: 137	34
Patel (109)	SBC: 41	58,5
Regina (111)	TP: 42	18
Primignani (110)	SBC: 20	40
	TP: 73	35,6
Mc Mahon (108)	SBC o TP: 42	17

Llama la atención la variabilidad en los resultados obtenidos, en los que la frecuencia de la mutación oscilaba entre el 17% y el 58%, según las series. Dicha variación puede deberse a la diferente sensibilidad de las técnicas empleadas para la detección de la mutación, al tipo de fuente de DNA o a la selección de pacientes. Hay que resaltar que todos los estudios citados son retrospectivos, por lo que el DNA se obtuvo de bancos de DNA o de laminillas de médula ósea. Kiladjian et al estudiaron un total de 241 pacientes, 104 afectados de SBC y 137 con TP, observando la mutación V617F del gen JAK2 en

un 45% de los pacientes con SBC y un 34% de los pacientes con TP (107). La adición del estudio de la mutación de JAK2 a la biopsia y al cultivo de colonias eritroides supuso un incremento del 20% en la detección de un SMPC en los pacientes con este tipo de trombosis (107). Patel et al obtuvieron resultados similares, ya que 12 de 24 pacientes con biopsia medular normal y 13 de 24 pacientes sin crecimiento endógeno de colonias eritroides presentaban la mutación de JAK2, permitiendo por tanto establecer el diagnóstico de SMPC en estos casos(109). La presencia de la mutación se asoció de forma significativa con valores de hemoglobina, leucocitos y plaquetas más altos, así como con una mayor esplenomegalia y una mayor masa eritrocitaria que en los pacientes sin la mutación.

Los factores involucrados en el desarrollo de las trombosis de las arterias suprahepáticas y del eje espleno-portal no son bien conocidos. Se cree que al enlentecimiento del flujo sanguíneo hepático como consecuencia del aumento de la masa eritrocitaria, la trombocitosis y las alteraciones del funcionalismo plaquetario habría que añadir el aumento en el flujo hepático debido a la esplenomegalia y el aumento de la resistencia al flujo como consecuencia de la metaplasia mieloide hepática. Hasta la fecha no se han realizado estudios que hayan explorado el papel de la activación leucocitaria en las trombosis hepáticas.

En el estudio ECLAP, constituido por 1638 pacientes seguidos de forma prospectiva durante una mediana de tiempo de 2,8 años, la incidencia acumulada de trombosis fue 5,5 trombosis/100 pacientes/año. En la actualización más reciente de dicho estudio las variables asociadas con un riesgo aumentado de trombosis en el análisis multivariado fueron la edad > 65

años, el antecedente de trombosis, la presencia de leucocitosis $\geq 15 \times 10^9/L$ y el tabaquismo. En la tabla 6 se muestra la *odds ratio* y los intervalos de confianza de las principales variables asociadas a la aparición de trombosis en dicho estudio.

Tabla 6: Factores asociados a trombosis en los 1638 pacientes afectos de PV incluidos en el estudio ECLAP

Factor de riesgo	Odds ratio (IC 95%)
Edad > 65 años	2,89 (1,98-4,22)
Antecedente de trombosis	1,69 (1,21-2,36)
Tabaquismo*	1,9 (1,15-3,14)
Leucocitos > $15 \times 10^9/L$	1,7 (1,1-2,6)

A partir de los resultados de esta serie, Marchioli et al propusieron en el año 2005 la existencia de tres grupos de riesgo para el desarrollo de complicaciones tromboticas en la PV. Un grupo de alto riesgo de trombosis, constituido por pacientes con edad > 65 años y antecedente de trombosis, en el cual la incidencia acumulada de trombosis sería de 10.9 trombosis/100 pacientes/año, un grupo de riesgo intermedio, al que pertenecerían tanto los pacientes con menos de 65 años y trombosis previa como los mayores de 65 años sin trombosis previa, con una incidencia acumulada de 5 trombosis/100 pacientes/año y, por último, el grupo de bajo riesgo, constituido por pacientes de edad menor a 65 años y sin antecedente, cuya incidencia acumulada fue de 2.5 trombosis/100 pacientes/año (86).

Tras el descubrimiento de la mutación de V617F de JAK2, presente en la mayoría de pacientes con PV, se ha investigado si la carga alélica de JAK2 se correlaciona con un mayor riesgo para el desarrollo de complicaciones trombóticas. Tefferi et al, en un estudio realizado a partir de material obtenido de laminillas de médula ósea procedentes de 58 pacientes con PV, no encontraron asociación entre la presencia de la mutación en estado homocigoto y un mayor riesgo de trombosis que en los pacientes heterocigotos (112). Por otro lado, en este mismo estudio tampoco hubo diferencias significativas entre pacientes homo y heterocigotos en cuanto a la edad, el sexo y la cifra de leucocitos o plaquetas al diagnóstico. Sin embargo, el estado homocigoto de la mutación se asoció a valores iniciales de Hb más altos, mayor frecuencia de prurito y un mayor riesgo de evolución a mielofibrosis que en los pacientes heterocigotos (112). Estos hallazgos indicarían que la carga alélica de JAK2 podría determinar las características clínicas de los pacientes, si bien el reducido tamaño de la serie analizada impedía sacar una conclusión definitiva al respecto. Vannucchi et al realizaron un estudio similar en 323 pacientes afectados de PV JAK2 positiva, 104 de los cuales eran homocigotos (113). 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 prurito y esplenomegalia que los pacientes heterocigotos, confirmando, por tanto, que el estado mutacional de JAK2 se asocia con un perfil clínico de hiperproliferación. Sin embargo, de nuevo tampoco se pudo demostrar la asociación entre el estado mutacional de JAK2 y la incidencia de trombosis (113). Algunas de las limitaciones de este último estudio eran el carácter retrospectivo del mismo 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. Además, es bien conocido que en la mayoría de pacientes con PV coexisten progenitores homocigotos y heterocigotos para la mutación, incluso cuando la determinación en granulocitos ha sido considerada como heterocigota (27). En un intento de dilucidar el significado de la carga alélica de la mutación de JAK2 en el perfil clínico de la PV, Vannucchi et al han publicado recientemente los resultados obtenidos en 173 pacientes con PV, seguidos de forma prospectiva, en los que se determinó la carga alélica de JAK2 al diagnóstico mediante PCR cuantitativa (114). En dicho estudio el porcentaje de alelos mutados se correlacionó con cifras de Hb y leucocitos más altas, indicando por tanto una mayor estimulación de la eritropoyesis y la mielopoyesis, así como con una mayor expresión de marcadores de activación leucocitaria. Además, los pacientes portadores de más de un 75% de alelos mutados tenían un riesgo 7 veces más alto de presentar complicaciones cardiovasculares durante la evolución de la enfermedad que los pacientes con una carga alélica inferior al 25%. En la tabla 7 se muestran las diferentes variables clínicas y hematológicas en los pacientes con PV en función de la carga alélica de JAK2. De dichos resultados se puede concluir que la medición del porcentaje de alelos mutados por PCR cuantitativa al diagnóstico podría ayudar a identificar a los pacientes con un mayor riesgo de trombosis.

Tabla 7: Características clínico-hematológicas según la carga alélica de la mutación V617F de JAK2 en 173 pacientes con PV

Variable	1-25%	25-50%	50-75%	75-100%
	n=58	n=50	n=33	n=32
Mujeres, n (%)	16 (28)	23 (46)	16 (48)	16 (50)*
Hematócrito, %**	54 ± 2	54 ± 5	57 ± 6	57 ± 6*
Leucocitos x 10 ⁹ /L**	9 ± 2,4	10,6 ± 4,1	11,7 ± 3,6	13,9 ± 7,6*
Plaquetas x 10 ⁹ /L**	524 ± 265	500 ± 186	483 ± 169	452 ± 178
LDH**	311 ± 107	326 ± 128	455 ± 216	524 ± 210*
FAG**	125 ± 55	145 ± 54	203 ± 57	280 ± 57*
Trombosis, %	10	14	24	37*
Tratamiento citorreductor, %	44	46	53	78*

LDH: lactato dehidrogenasa sérica, FAG: fosfatasa alcalina granulocitaria.

*p<0.05, **media ± desviación típica

1.2 Mielofibrosis primaria

1.2.1 Etiopatogenia de la MFP

La mielofibrosis primaria (MFP) es una hemopatía maligna originada en un progenitor hemopoyético clonal común a las series mieloide y linfoide en la cual la fibrosis de la médula ósea constituye un fenómeno secundario a una reacción de las células del microambiente medular no involucradas en el proceso neoplásico (115-121). El origen clonal de la MFP se ha demostrado mediante análisis basados en los patrones de inactivación del cromosoma X (122,123) y estudios citogenéticos (124) y mutacionales (119). Mientras que los progenitores hemopoyéticos son clonales, los fibroblastos medulares de la MFP son policlonales y se comportan desde el punto de vista funcional de manera similar a los fibroblastos de la médula ósea normal, ya que muestran dependencia del suero y anclaje para su crecimiento, inhibición por contacto y una producción similar de factores de crecimiento hemopoyéticos (121,123,125). Además de la proliferación clonal, en los pacientes con MFP se han registrado diversas alteraciones en la médula ósea, tales como un aumento del número de células del estroma (126), y en las proteínas de la matriz extracelular (127), así como de la angiogénesis (128) y la osteoesclerosis. Estas alteraciones en el microambiente medular coexisten con alteraciones en la concentración celular y extracelular de diversas citocinas que intervienen en la fibrosis, angiogénesis y osteogénesis. Actualmente existe un consenso claro en cuanto al hecho de que la reacción estromal presente en los pacientes con MFP es un proceso reactivo mediado por las citocinas producidas por el clon hemopoyético maligno. Así, se ha descrito que tanto los

monocitos (126,129) como los megacariocitos (130-133) liberan PDGF (134) y calmodulina (135), que intervienen en la proliferación de los fibroblastos, TGF β (134), que induce la síntesis de colágeno y ósea, y VEGF, que interviene en la angiogénesis (132,136). Por tanto, dado que la fibrosis medular es un epifenómeno de la proliferación neoplásica, dicha fibrosis debería desaparecer al erradicar el clon neoplásico. Esta hipótesis se ha visto confirmada en los pacientes con MFP receptores de un trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos, en los que se observó una desaparición de la fibrosis medular tras el trasplante (137-139).

1.2.1.1 Papel de la hemopoyesis clonal

El concepto de que la alteración primaria de la MFP reside en un progenitor hemopoyético pluripotente se ha visto reforzado con la descripción por diferentes investigadores de que en la sangre de los pacientes con MFP existe un aumento en el número de células progenitoras hemopoyéticas (140-142). Así, el número de células CD34+ circulantes es 360 veces mayor en los pacientes con MFP que en los controles sanos y hasta 30 veces más alto que en los pacientes con PV o TE(143-145). Este hallazgo es tan marcado que se ha sugerido que una concentración de células CD34 en sangre periférica superior a $15 \times 10^6/L$ permitiría distinguir la MFP de la PV o la TE. Además, Barosi et al describieron que el número de células CD34+ aumenta con la progresión de la enfermedad y que un valor superior a $300 \times 10^6/L$ se correlacionaría con la evolución a corto plazo a leucemia aguda (143). Estas observaciones hacen pensar que en la MFP existiría un tráfico anormal de los progenitores hemopoyéticos debido a una capacidad disminuida de estas

células para quedarse retenidas en la médula ósea, por lo que se produciría, por tanto, una salida prematura de las mismas a la circulación sanguínea. Se desconoce la causa que produce esta alteración, pero parece ser una de las características fundamentales dentro de los defectos celulares que dan lugar a la MFP.

Al igual que en otros síndromes mieloproliferativos, en la MFP también existe crecimiento endógeno de colonias eritroides y megacariocíticas sin necesidad de añadir factores de crecimiento al medio de cultivo (140-142). En este sentido, Taskin et al describieron de forma convincente la existencia de crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas en la MFP, descartando teorías previas en las que se atribuía dicho fenómeno a una estimulación paracrina (146,147). El descubrimiento de la mutación V617F de JAK2, presente en más del 50% de los pacientes con MFP, vino a explicar los mecanismos involucrados en la existencia de crecimiento endógeno de progenitores mieloides a partir de la sangre periférica de los pacientes con MFP (2-6). Dichos mecanismos han sido expuestos con detalle en la sección correspondiente a la PV.

Recientemente se ha descrito que la mutación de JAK2 está presente tanto en los neutrófilos como en las células CD34+ de los pacientes afectados de TE, PV y MFP. Sin embargo, el porcentaje de células con la mutación varía según la enfermedad. Así, mientras que en la TE la carga alélica de JAK2 determinada mediante PCR cuantitativa es del 39% en los neutrófilos y del 25% en las células CD34+, en la PV dicha carga aumenta al 64% y al 56%, respectivamente, mientras que en la MFP el 77% de ambas poblaciones presentan la mutación (148). Basándose en estos hallazgos se ha definido

dominancia clonal cuando la diferencia entre el porcentaje de neutrófilos y células CD34+ con la mutación de JAK2 es igual o inferior al 10%. En un estudio, este fenómeno 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, por lo que se ha sugerido que la dominancia clonal desempeñaría un papel clave en el desarrollo de un fenotipo de mielofibrosis a partir de la mutación de JAK2 (148).

La mutación V617F de JAK2 tiene lugar en un precursor hemopoyético multipotente capaz de generar tanto células linfoides como mieloides(149). No obstante, las células CD34+ de los pacientes con MFP presentan una alteración en el programa de diferenciación asociado a una mayor proliferación mieloides. Ello se demostró en un modelo murino en el que los ratones trasplantados con progenitores de pacientes con MFP tenían un mayor número de células CD34+, CD33+ y CD41+ y menor de CD19+ que los trasplantados con progenitores procedentes de controles sanos (150). En este sentido, también se ha demostrado que cuando las células CD34+ de los pacientes con MFP se incuban *in vitro* en presencia de TPO y SCF dan lugar a una diferenciación megacariocítica 24 veces mayor que la de los progenitores procedentes de donantes sanos (151). Además, estos megacariocitos tienen un sobreexpresión de Bcl-XL, factor que confiere resistencia a la apoptosis (151). La hiperplasia megacariocítica característica de la MFP sería el resultado, por tanto, de un aumento en la capacidad de diferenciación hacia esta línea de los progenitores CD34+ y de una disminución de la apoptosis de los propios megacariocitos.

Recientemente se han descrito varias mutaciones que afectan al aminoácido 515 del gen que codifica para el receptor de la trombopoyetina, el receptor c-Mpl (152,153). Estas mutaciones son las primeras descritas en los SMPC que afectan a un receptor de citocinas. 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 alteraciones descritas en esta región, concretamente las mutaciones W515K y W515L, provocan la dimerización del receptor en ausencia del ligando y la activación constitutiva de la vía de transducción de señales dependiente de este receptor (152,153). La prevalencia de estas mutaciones en los pacientes con MFP oscila entre el 5% y el 10% (152,153). La citada mutación se detectó en 6 pacientes con MFP que eran positivos para la JAK2V617F, lo que indica que ambas mutaciones no son mutuamente excluyentes, observándose en dos casos la coexistencia de las mutaciones W515K y W515L. Es de destacar que en ningún caso se detectaron mutaciones del c-Mpl en pacientes afectados de PV, lo que sugeriría que estas mutaciones favorecerían el desarrollo preferencial de la línea megacariocítica con respecto a la eritroide. Esta hipótesis ha sido confirmada por Chaligne et al 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 (154). El papel etiopatogénico de la mutación W515L de MPL en la MFP se puso asimismo de manifiesto en un modelo murino en el que los ratones trasplantados con progenitores portadores de dicha mutación desarrollaron un síndrome mieloproliferativo rápidamente progresivo, caracterizado por leucocitosis,

trombocitosis, esplenomegalia y fibrosis medular, pero no eritrocitosis, que producía la muerte a los 18 días del trasplante (152).

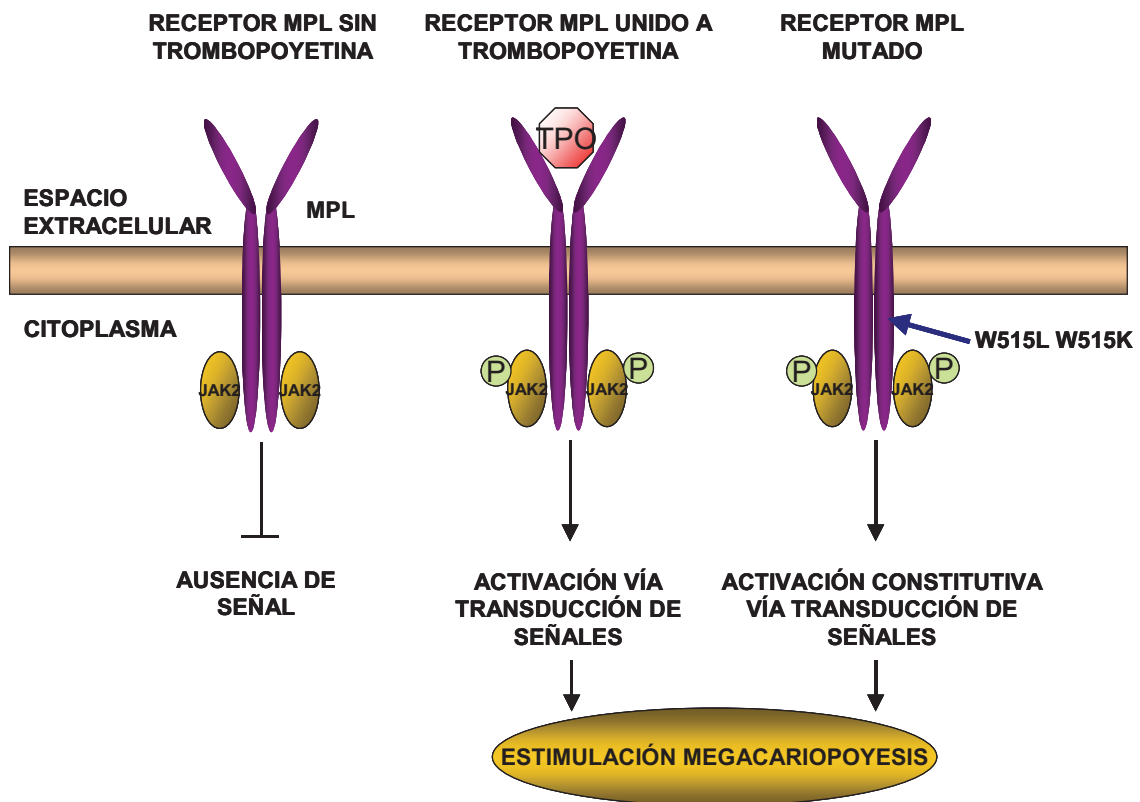


Figura 2: : Mecanismo de acción del receptor de MPL. En condiciones normales cuando el receptor de la trombopoyetina (MPL) no está unido a su ligando la proteína JAK2 permanece desfosforilada, sin que transmita ninguna señal al interior celular. Tras la unión con la TPO, el MPL se dimeriza y activa, produciéndose la fosforilación de JAK2, la cual, a su vez, fosforila diferentes proteínas que intervienen en la transmisión de señales al interior celular lo que resulta en un estímulo de la megacariopoyesis. Cuando el receptor MPL alberga la mutación W515K o W515L, se produce la dimerización del receptor en ausencia de ligando, dando como resultado una activación continua de las vías de transmisión de señales.

En torno al 50% de los pacientes con MFP carecen de mutaciones de JAK2 y MPL pero, sin embargo, tienen una hemopoyesis clonal. Además, estos pacientes son similares desde el punto de vista clínico a aquellos que presentan las mutaciones anteriormente citadas. Esta observación indica que en la etiopatogenia de la MFP podrían intervenir otros mecanismos genéticos o epigenéticos. Estudios de hibridación genómica comparada han mostrado que en la MFP existen ganancias de material genético localizadas en los cromosomas 9p, 2q, 3p, 4, 12q y 13q (155). También se ha identificado una traslocación no balanceada entre los cromosomas 1 y 6 con puntos de ruptura fijos, que parece ser altamente específica de la MFP (156). Todos estos cromosomas pueden, por tanto, albergar genes involucrados en el origen de la MFP.

1.2.1.2 Fisiopatología de la hemopoyesis extramedular

Muchas de las manifestaciones clínico-hematológicas de la MFP se pueden atribuir a la hemopoyesis extramedular característica de esta enfermedad. Inicialmente se había sugerido que la hemopoyesis extramedular era consecuencia de la expansión de progenitores hemopoyéticos quiescentes, retenidos en lugares en los que existió una hemopoyesis embrionaria previa como es el caso del bazo (157). Esta hipótesis fue posteriormente cuestionada, ya que el bazo no es una localización en la que se produzca una hemopoyesis fetal prominente y, además, en la MFP se puede encontrar hemopoyesis extramedular en lugares en los que no existe antecedente de hemopoyesis fetal (158). Como ya se ha comentado, en la MFP existe una

alteración en la circulación de los progenitores hemopoyéticos, de tal forma que tiene lugar un aumento en la salida de dichos progenitores de la médula ósea. Como consecuencia, se produce un filtrado de las células CD34+ en el bazo, donde se acumulan progresivamente y continúan proliferando, lo que, a su vez, da lugar a un desequilibrio en la localización de los progenitores hemopoyéticos, de tal forma que en la MFP el número de células CD34+ es mayor en el bazo que en la médula ósea (144). La metaplasia mieloide del bazo se asocia a la presencia de alteraciones en su arquitectura entre los que se incluyen el aumento en el número de megacariocitos y megacarioblastos (144). Otro hallazgo constante en la MFP es la presencia de hemopoyesis intravascular, localizada fundamentalmente en el interior de los sinusoides medulares (159). Ello se ha interpretado como una consecuencia directa de la fibrosis medular, que daría lugar a una distorsión de los sinusoides permitiendo la entrada de los progenitores hemopoyéticos en los mismos y su posterior acceso al torrente sanguíneo (159,160). En condiciones normales dichas células son filtradas por el bazo, donde posteriormente se destruyen. Sin embargo, cuando el número de progenitores excede la capacidad de filtrado del bazo éstos pueden iniciar el proceso de la hemopoyesis en la circulación sanguínea, dando lugar al característico cuadro clínico del síndrome leucoeritroblástico, y posibilitando que se produzcan focos de hemopoyesis extramedular en localizaciones inusuales (159).

1.2.1.3 Papel de los factores de crecimiento y las citocinas

El aumento de los depósitos de colágeno tipo IV, asociado a una proliferación de células endoteliales, constituye una alteración arquitectural

característica de la médula ósea de los pacientes con MFP (159,160). Además, la hiperplasia de los sinusoides y la hipervascularización dan lugar a un aumento del flujo sanguíneo medular (160). En comparación con sujetos normales y con pacientes afectados de PV, en la MFP existe un incremento significativo en el número de sinusoides medulares, así como en los depósitos de colágeno tipo IV. La evolución a la fase de osteoesclerosis se acompaña de un aumento progresivo en los depósitos de colágeno tipo IV con una marcada expansión luminal irregular. La formación de una red de vasos sanguíneos o neangiogénesis no es específica de la MFP, ya que dicho proceso también se observa en otras enfermedades en las que existe liberación de factores angiogénicos por parte de las células tumorales (161). Este aumento de la vasculatura medular se ha demostrado mediante estudios de inmunohistoquímica y se ha correlacionado tanto con el tamaño del bazo como con una menor supervivencia de los pacientes (128). Dichos vasos son anormales, observándose frecuentemente abundantes nidos constituidos por vasos tortuosos y de pequeño tamaño (128,161). Se ha postulado que la neoangiogénesis sería producto de la liberación del contenido de los gránulos alfa de los megacariocitos (159). En este sentido, cabe mencionar que el TGF- β tiene un efecto claramente angiogénico. La evolución a la fase de osteoesclerosis parece estar claramente relacionada con la proliferación vascular y la liberación de factores de crecimiento por parte de los megacariocitos anormales. Tanto el FGFb como el VEGF han sido implicados en la neoangiogénesis (147,162,163). En la MFP se ha registrado un aumento en la concentración plasmática de VEGF y un aumento en la expresión de FGFb por parte de los megacariocitos y las plaquetas (147,162,163). Es

probable que estas citocinas sean liberadas a partir de los megacariocitos anómalos presentes en la MFP y que ello produzca como consecuencia la proliferación vascular. Una explicación alternativa, aún por demostrar, sería que el hemangioblasto, progenitor hemopoyético con capacidad para diferenciarse a célula endotelial, formase parte de la proliferación clonal y, por tanto, fuese el origen de la angiogénesis (164).

El primer estudio que formuló la hipótesis de que los factores de crecimiento liberados por las células neoplásicas producían la estimulación y posterior proliferación de los fibroblastos medulares fue el de Groopman et al, quienes sugirieron a su vez que la liberación de estos factores de crecimiento corría a cargo de los megacariocitos (165). La hipótesis del posible papel de los megacariocitos en la aparición de la fibrosis de la MFP se ve reforzada por la presencia de hiperplasia megacariocítica, constituida por elementos displásicos e incluso necróticos, característica de la enfermedad (131,131). Posteriormente, Castro-Malaspina et al demostraron que tanto los megacariocitos como las plaquetas purificados a partir de muestras de médula ósea inducían la síntesis de DNA en los fibroblastos cuando dichas fracciones celulares purificadas se incubaban con fibroblastos (130). A partir de las observaciones de este estudio se elaboró la hipótesis de que la liberación de cantidades excesivas de estos factores de crecimiento sería el producto de una megacariopoyesis ineficaz, lo cual a su vez daría lugar a una expansión de los fibroblastos medulares y a la consiguiente síntesis de colágeno (130). Los gránulos alfa de los megacariocitos y de las plaquetas contienen PDGF, TGF- β y EGF. Dichos factores de crecimiento tienen la capacidad de estimular la proliferación de los fibroblastos (134,166,167). El TGF- β induce la síntesis de

procolágeno tipo I, III y IV, de condroitín y dermatán sulfato y de fibronectina por parte de los fibroblastos medulares (134). Además, induce una disminución en la síntesis de varias colagenasas que degradan la matriz extracelular, al mismo tiempo que promueve la síntesis de inhibidores de proteasas como el PAI-1 (168). El efecto neto de estas complejas interacciones entre diferentes moléculas es la acumulación de matriz extracelular que, a su vez, contribuye a un aumento progresivo de la fibrosis.

Tabla 8. Principales efectos biológicos del TGF- β que dan lugar a un aumento de la matriz extracelular y la fibrosis en la MFP

Tipo de proteína	Efecto del TGF- β
Pro-colágeno tipos I, III y IV	+
Condroitín y dermatán-sulfato	+
Fibronectina	+
Colagenasa	-
Inhibidores de proteasas (PAI-1)	+

También se ha postulado que los fibroblastos de los pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos son más sensibles a los mitógenos que los fibroblastos medulares normales (169). Del mismo modo, se ha descrito una disminución en el contenido de PDGF en las plaquetas de los pacientes con MFP, hallazgo que podría indicar que en estos pacientes se produce un aumento en la liberación de PDGF por parte de las plaquetas o de los megacariocitos (147). Martyre et al registraron un contenido intraplaquetar de PDGF y TGF- β en las plaquetas de los pacientes con MFP significativamente

más alto que en los controles sanos, mientras que la concentración de EGF era similar en ambos grupos (170). La liberación de PDGF y TGF- β produciría no sólo la proliferación de fibroblastos sino también la alteración en la síntesis, secreción y degradación de las componentes de la matriz extracelular (166,167). Un dato adicional que refuerza la hipótesis de que el TGF- β juega un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis medular es el hallazgo de una expresión aumentada de ARNm de TGF- β en las células mononucleadas, así como de la presencia de TGF- β en el citoplasma de los megacariocitos circulantes de los pacientes con MFP (131,147,170).

Probablemente en el desarrollo de la fibrosis medular también estén involucrados otros factores de crecimiento, como el bFGF o la calmodulina. Los megacariocitos y las plaquetas circulantes de los pacientes con MFP tienen niveles altos de bFGF, el cual es un potente inductor de la angiogénesis así como un mitógeno de las células estromales de la médula ósea (132). Es posible, por tanto, que el bFGF esté implicado en la marcada neoangiogénesis existente en la MFP. Por su parte, la calmodulina se almacena en las plaquetas y su liberación induce la mitosis de los fibroblastos (166,167). La excreción urinaria de calmodulina está aumentada en los pacientes con MFP, por lo que dicha proteína también podría tener un papel en la génesis de la fibrosis medular (171).

Tabla 9: Factores de crecimiento e interleucinas involucrados en la patogenia de la MFP

	Fibrosis	Neoangiogénesis
TGF-β	+	+
FGFb	+	+
VEGF		+
PDGF	+	
Calmodulina	+	

El papel de los megacariocitos y las plaquetas en la aparición de la fibrosis medular se ha dilucidado empleando un modelo murino en el que los ratones se trasplantaron con progenitores modificados genéticamente para inducir una sobreexpresión de TPO. En dicho modelo, los ratones desarrollaron un cuadro clínico caracterizado por trombocitosis, hiperplasia megacariocítica, fibrosis medular, incremento en el número de células CD34+ circulantes, osteoesclerosis y hemopoyesis extramedular. Además, en estos ratones la concentración de TGF- β y PDGF en plasma pobre en plaquetas estaba elevada con respecto a los ratones contro I(172,173). Si dichos ratones se volvían a trasplantar con progenitores normales ello ocasionaba una normalización de la trombocitosis y una desaparición de la hiperplasia megacariocítica, así como una regresión de la fibrosis medular y la osteoesclerosis (172). Estos experimentos confirman el importante papel de los megacariocitos y las plaquetas en el desarrollo de la fibrosis medular en la MFP.

El mecanismo subyacente a la liberación anómala de citocinas por parte de los megacariocitos en la MFP es desconocido. Se ha sugerido que la emperipolesis, fenómeno en el que los leucocitos y los precursores hemopoyéticos quedan rodeados por los megacariocitos, podría desempeñar un papel al respecto, ya que en la MFP existe un aumento de la emperipolesis de neutrófilos y eosinófilos, así como una mayor liberación de MPO por parte de los neutrófilos que han sufrido este proceso (174). En este último estudio se correlacionó el grado de emperipolesis con el grado de fibrosis medular, sugiriendo, además, que el secuestro de los neutrófilos por parte de los megacariocitos podría ser la consecuencia de una alteración en la expresión de la P-selectina de los megacariocitos.

Los megacariocitos no son las únicas células capaces de liberar citocinas con potencial fibrogénico. Los monocitos y los macrófagos de los pacientes con MFP tienen una capacidad aumentada de producir TGF- β e IL-1, si bien su liberación sólo se produce tras adherirse a la matriz extracelular (129). Parece, pues, que la adhesión de los monocitos a las proteínas de la matriz extracelular podría tener un papel en la liberación de citocinas fibrogénicas. En dicha interacción entre monocitos y matriz extracelular podrían intervenir diferentes proteínas de adhesión del monocito, como el CD44, cuyos ligandos son la fibronectina, el ácido hialurónico y el colágeno. Se ha postulado asimismo que en los monocitos de los pacientes con MFP existiría una sobreexpresión de NF- κ B que daría lugar a un aumento en la producción de TGF- β e IL-1 (175). El NF- κ B es un factor de transcripción pro-inflamatorio con un papel clave en la síntesis de IL1 y TGF- β . Por tanto, los anteriores hallazgos sugieren que en la MFP existiría una activación monocitaria basal. No obstante,

al contrario de la PV o la TE, existen pocos estudios que hayan evaluado la activación leucocitaria en la MFP.

1.2.2 Manifestaciones clínicas de la MFP

La MFP es una enfermedad heterogénea en cuanto a su presentación clínica y evolución (176-178). En torno a un 20% de los pacientes se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico. En estos casos la sospecha diagnóstica se establece a partir del estudio de anomalías de laboratorio detectadas en una analítica de rutina o tras el hallazgo de una esplenomegalia en un examen físico general. La anemia es la manifestación clínica más frecuente de la MFP, ya que en torno al 50% de los pacientes presentan sintomatología anémica al diagnóstico y un 60% de ellos desarrollan anemia intensa posteriormente (179-181). La sintomatología constitucional, en forma de pérdida de peso, sudoración nocturna o fiebre, está presente en torno al 20-30% de los pacientes inicialmente. Los síntomas derivados de la esplenomegalia, tales como la sensación de saciedad precoz o el dolor en hipocondrio izquierdo debido a la ocupación de dicho espacio o a infartos esplénicos es habitual. También es frecuente la presencia de diarrea, atribuida a la compresión que ejerce el bazo sobre el colon o el intestino delgado. En la tabla 10 se recogen las principales manifestaciones clínicas presentes en el momento del diagnóstico en tres series de pacientes con MFP.

Tabla 10: Síntomas y signos presentes en el momento del diagnóstico de la MFP

Signo/síntoma, %	Varki et al (178) N=88	Silverstein et al (181) N=106	Visani et al (177) N=133
Astenia	71	58	47
Fiebre	5	10	5
Pérdida de peso	39	15	7
Sudor nocturno	21	6	-
Esplenomegalia sintomática	11	23	48
Palidez	-	60	-
Petequias/equimosis	20	15	-
Esplenomegalia	89	90	99
Hepatomegalia	64	70	39
Hemorragia	20	17	5
Edema periférico	13	-	-
Hipertensión portal	2	6	2
Adenopatías	2	10	1
Ictericia	0	4	-
Gota/litiasis renal	13	6	-
Ausencia de síntomas	21	30	16

La trombocitopenia está presente en el 31% de los pacientes, siendo la principal causa de la aparición de complicaciones hemorrágicas (181). Dichas complicaciones pueden ser leves, como petequias o hematomas, o graves e incluso letales cuando aparece hemorragia digestiva alta o sangrado post-quirúrgico, especialmente post-esplenectomía (179-181). Además de la trombocitopenia, existen otros factores favorecedores de la hemorragia, como las alteraciones en el funcionalismo plaquetario, concretamente la ausencia de agregación en respuesta a determinados agonistas plaquetarios como la epinefrina y el colágeno, las alteraciones en el tiempo de hemorragia y en el de protrombina y la coexistencia de coagulación intravascular diseminada en algunos pacientes (181-183).

Otras manifestaciones menos frecuentes de la MFP son consecuencia de la aparición de focos de hemopoyesis extramedular, que afectan a la piel, el pulmón, el SNC, el hígado y el tracto urinario (180). Así, pueden aparecer tos persistente y tumores pulmonares (184), cefalea y parálisis asociados a tumores cerebrales o medulares (185), tumores de vías urinarias (186) y obstrucción del intestino delgado (187), todos ellos como consecuencia de focos de metaplasia mieloide. También se ha observado ascitis refractaria al tratamiento, secundaria a implantes peritoneales de tejido hemopoyético, en cuyo caso el líquido ascítico es un exudado con presencia de células hemopoyéticas en el examen citológico (188,189).

La clínica de hipertensión portal en forma de ascitis, sangrado por varices esofágicas, el fallo hepático o la hemosiderosis secundaria complican el curso clínico de la MFP en el 9%-18% de los pacientes (190-192). En la mayoría de los casos, la hipertensión portal es consecuencia de una cirrosis o

de la trombosis de las venas suprahepáticas o las del eje espleno-portal (190,193). Sin embargo, una minoría de pacientes presentan clínica de hipertensión portal en ausencia de trombosis o cirrosis (194-198). En estos casos la principal alteración que se observa en la biopsia hepática es la infiltración por precursores hemopoyéticos sin alteración de la arquitectura hepática. Se desconoce la causa de la hipertensión portal en estos pacientes. Se ha atribuido al aumento del flujo sanguíneo hepático como consecuencia de la esplenomegalia (190,194), y la resistencia al flujo sanguíneo intrahepático debido a la metaplasia mieloide (195,196) o a la obstrucción al flujo por microtrombosis de las vénulas hepáticas (192).

La hipertensión pulmonar es una complicación grave descrita asimismo en los sujetos con MFP (199,200). Se manifiesta en forma de disnea progresiva y fallo cardíaco derecho y generalmente produce la muerte del paciente a corto plazo. Se desconoce la causa de la misma, pero se ha atribuido al antecedente de tromboembolismo pulmonar que presentan algunos pacientes o, alternativamente, a la hemopoyesis extramedular y la fibrosis pulmonar resultado de la liberación de citocinas por los megacariocitos presentes en el parénquima pulmonar (199,200).

Por último, en lo que respecta a las complicaciones trombóticas en la MFP, ha habido escasas publicaciones, basadas en series con un número reducido de pacientes, en las que se sugería un aumento de trombosis en la MFP (201,202). Brodmann et al estudiaron la incidencia de complicaciones vasculares en 102 pacientes afectos de un síndrome mieloproliferativo, de los cuales 26 tenían una MFP. En dicho estudio se observó un total de 10 complicaciones trombóticas (6 venosas y 4 arteriales) en los pacientes con

MFP, lo cual suponía una incidencia de 13,8 trombosis/100 pacientes/año, dato similar al observado en los pacientes con PV y TE, cuya incidencia fue de 16,7 y 7,5 trombosis/100 pacientes/año, respectivamente. En la citada serie las trombosis cerebrales y venosas profundas supusieron el 70% de las trombosis, dato que, a pesar del pequeño tamaño de la muestra, sugeriría que la incidencia de este tipo de trombosis estaría aumentada en la MFP (201). Por otro lado, Ganti et al estudiaron 181 pacientes con SMPC, 30 de ellos con MFP, en los cuales se evaluó el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica. Sorprendentemente, los pacientes con MFP presentaron un riesgo 8 veces mayor de padecer dicha complicación que un grupo control constituido por pacientes con leucemia mieloide crónica. Sin embargo, cuando en el análisis multivariado se corrigió el riesgo teniendo en cuenta la edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular, tal asociación desapareció, lo que indicaba que el exceso de trombosis observado en la MFP era más bien debido a la edad más avanzada de este grupo de pacientes (202). Recientemente, Tefferi et al registraron 9 complicaciones trombóticas en una serie de 157 pacientes, lo que supone una frecuencia del 6% (203). En dicha serie la presencia de la mutación V617F de JAK2 se asoció con un riesgo mayor de trombosis. Sin embargo, una limitación importante de este estudio es que en el 25% de los pacientes la mielofibrosis no era primaria sino secundaria a una PV o TE previas. Por último, en la MFP se ha asociado la esplenectomía con la aparición de trombosis, sobre todo en los vasos intrabdominales y en los pacientes con trombocitosis (204,205). No existen, por tanto, estudios realizados en series amplias en los que se haya estudiado de forma específica la incidencia real de trombosis en la MFP, así como los factores de riesgo asociados a la aparición

de dicha complicación. A falta de estudios específicos, dada la edad generalmente avanzada de los pacientes con MFP, tampoco se puede afirmar que la incidencia de trombosis se halle aumentada con respecto a la de la población general. No obstante, el hecho de que en torno a la mitad de los pacientes con MFP presenten la mutación de JAK2 y que dicha mutación se asociase a un mayor riesgo trombótico sugiere que en la MFP, al igual que en la PV y la TE, podría existir un aumento en el riesgo de complicaciones trombóticas y que los mecanismos involucrados en la patogénesis de la trombosis descritos en la PV y la TE también podrían operar en la MFP.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El curso clínico de la PV y la TE, los dos síndromes mieloproliferativos crónicos más frecuentes, se caracteriza por un elevado riesgo de aparición complicaciones trombóticas, las cuales constituyen la principal causa de muerte en los pacientes con PV. En esta enfermedad, la causa fundamental de la trombosis es el aumento de la viscosidad sanguínea secundario a la eritrocitosis, así como el incremento del número de plaquetas y las alteraciones funcionales de las mismas. Sin embargo, estudios recientes sugieren un posible papel al respecto de los granulocitos. En este sentido, se ha comunicado que la presencia de leucocitosis en el momento del diagnóstico de la PV se asocia a un riesgo trombótico mayor. A ello hay que añadir estudios que demostraron que los pacientes con PV presentan una mayor activación basal de los leucocitos y un porcentaje mayor de complejos leucocito-plaqueta circulantes que los individuos sanos. Estos hallazgos sugieren que la activación leucocitaria puede tener un papel en la patogenia de la trombosis de la PV. Sin embargo, no se han realizado estudios que correlacionen los diferentes parámetros de activación leucocitaria con el antecedente de trombosis.

Por otro lado, se desconoce si, al igual que en la PV y la TE, los pacientes con MFP presentan un riesgo aumentado de trombosis. Además, apenas existen estudios que hayan analizado la activación leucocitaria y plaquetaria en esta enfermedad.

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

1. Analizar la activación de los granulocitos y la interacción leucocito-plaqueta en pacientes con PV, con y sin trombosis del eje esplenoportal o síndrome de Budd-Chiari, a fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos que intervienen en la patogenia de la trombosis en dichos enfermos.
2. Determinar la incidencia de trombosis en los pacientes con MFP, comparándola con la de la población general, y analizar los factores de riesgo para su aparición.
3. Investigar si los pacientes con MFP presentan una activación leucocitaria, plaquetaria, endotelial y de la coagulación similar a la existente en la PV y la TE.
4. Determinar si en la MFP la posible sobreexpresión de dichos parámetros de activación se correlaciona con la presencia de la mutación del gen JAK2.

3. RESULTADOS

3.1. TRABAJO 1

Sobreexpresión del antígeno CD11b granulocitario en el síndrome de Budd-Chiari y la trombosis portal secundarios a policitemia vera.

Alvarez-Larrán A, García-Pagán JC, G. Abrales J, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, Cervantes F. Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari Syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia Vera. *British Journal of Haematology*, 2004; 124: 329-335.

3.1.1. RESUMEN

La policitemia vera (PV) se caracteriza por una intensa proliferación de la serie eritroide y, a veces, de la megacariocítica y granulocítica, siendo las complicaciones trombóticas la causa fundamental de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Dentro de las trombosis de la PV, las que afectan a las venas suprahepáticas (síndrome de Budd-Chiari, SBC) o a las del eje esplenoportal (TP) se encuentran entre las complicaciones más graves de la enfermedad, siendo, de hecho, la PV la principal causa de este tipo de trombosis.

La causa fundamental de la trombosis en la PV es el aumento de la viscosidad sanguínea, debido al incremento en el número de hematíes y plaquetas, junto a las alteraciones funcionales de éstas. Sin embargo, estudios recientes sugieren un posible papel de los granulocitos. Así, se ha descrito un aumento de la activación leucocitaria en los pacientes con PV, 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. En estos enfermos se observó asimismo un aumento de ciertos marcadores plasmáticos de hipercoagulabilidad, en concreto, el complejo trombina-antitrombina, el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) y el dímero-D.

Con la finalidad de dilucidar los mecanismos involucrados en la génesis del SBC y la TP de los pacientes con PV, en el presente trabajo de investigación se estudió la expresión de CD11b granulocitario, el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes en 17 pacientes afectados de PV que habían presentado SBC o TP.

Como grupos control se estudiaron 16 pacientes con PV sin ningún antecedente de trombosis, 20 pacientes con SBC/TP en los que se había descartado la existencia de un síndrome mieloproliferativo crónico concomitante y 20 individuos sanos. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del antígeno CD11b granulocitario, el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes eran significativamente más altos en los pacientes con PV que en los pacientes sin síndrome mieloproliferativo o los controles sanos. Además, la expresión de CD11b granulocitario, tanto basal como tras estímulo con F-MLP, fue significativamente más elevada en los pacientes con PV y trombosis que en los pacientes con PV sin trombosis. Estos resultados sugieren que la activación leucocitaria, y en concreto la sobreexpresión del antígeno CD11b, pueden desempeñar un papel en la patogenia del SBC y la TP en la PV.

Increased CD11b neutrophil expression in Budd–Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia vera

Alberto Alvarez-Larrán,¹ Juan Carlos García-Pagán,² Juan G. Abalde,² Eduardo Arellano,¹ Juan Carlos Reverter,³ Jaume Bosch² and Francisco Cervantes¹

¹Haematology Department, Institute of Haematology and Oncology, ²Hepatic Haemodynamic Laboratory, Liver Unit, Institut de Malalties Digestives, and ³Haemotherapy and Haemostasis Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

© 2004 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, **124**, 329–335

Received 1 September 2003; accepted for publication 29 October 2003

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

Polycythaemia vera (PV) is a myeloproliferative disorder characterized by a high thrombotic tendency (Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995). Suprahepatic venous thrombosis (Budd–Chiari syndrome, BCS) and portal vein thrombosis (PVT) are severe complications of PV, which represents the first cause of these thromboses in Western countries (Valla *et al*, 1988; Kudo, 1996; Perelló *et al*, 2002). In such patients, PV diagnosis can be difficult, as the disease features are often masked by plasma volume expansion, hypersplenism and bleeding derived from the portal hypertension.

The hyperviscosity secondary to the increased red cell mass is a well-recognized cause of thrombosis in PV (Spivak, 2002), with other causes being functional platelet abnormalities, thrombocytosis (McMullin *et al*, 2003) and coexistent coagulation disorders (Hoffman *et al*, 1999). A role for granulocytes has been suggested, based on the presence of an activated neutrophil

Summary

Budd–Chiari syndrome and portal vein thrombosis (BCS/PVT) are frequently associated with polycythaemia vera (PV). In an attempt to elucidate the mechanisms of BCS/PVT secondary to PV (T-PV), CD11b neutrophil expression, neutrophil oxidative burst and platelet–neutrophil complexes (PNC) were assessed in 17 such patients. Three groups served as controls: BCS/PVT not secondary to PV (T-nPV; $n = 20$), PV without thrombosis (PV-nT; $n = 16$), and healthy controls (HC; $n = 20$). Baseline CD11b expression (in mean fluorescence intensity units) was 101 [95% confidence interval (CI): 79–128] in T-PV patients, *versus* 25 (95% CI: 18–35) in T-nPV, 59 (95% CI: 43–80) in PV-nT, and 34 (95% CI: 25–48) in HC ($P < 0.001$). After *N*-formyl-*L*-methionyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanine activation, T-PV patients also showed higher CD11b values: 190 (95% CI: 151–238), *versus* 55 (95% CI: 41–72) in T-nPV, 111 (95% CI: 81–153) in PV-nT, and 77 (95% CI: 63–95) in HC ($P < 0.001$). In BCS/PVT, CD11b neutrophil expression had 90% specificity and 100% sensitivity for the association with PV. Finally, PV patients had higher oxidative burst and PNC than T-nPV patients or HC ($P < 0.05$). These results support a role for neutrophils in BCS/PVT secondary to PV and indicate that neutrophil CD11b expression could be of use for PV screening in BCS/PVT patients.

Keywords: Budd–Chiari syndrome, abdominal vein thrombosis, polycythaemia vera, thrombosis, neutrophils.

phenotype (Westwood *et al*, 1995; Falanga *et al*, 2000; Burgaleta *et al*, 2002). An increased production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils has also been reported (Samuelson & Berg, 1991; Iki *et al*, 1997). Moreover, the increased circulating platelet–neutrophil complexes (PNC) found in the non-stimulated blood of patients with myeloproliferative disorders has led to the suggestion that such an abnormality could be involved in the thrombotic complications of PV (Jensen *et al*, 2001). However, the relationship between the above laboratory findings and thrombosis has not been determined.

The present study aimed to clarify the thrombogenic mechanisms of BCS/PVT secondary to PV by assessing neutrophil oxidative burst, expression of membrane CD11b and PNC. Additionally, we also sought to ascertain whether these laboratory tests could be of use in screening for underlying PV in patients with such thrombotic complications.

Patients and methods

Patients and diagnostic criteria

The study group included 37 patients consecutively referred to the Hepatic Haemodynamic Unit of the Hospital Clínic of Barcelona between 1995 and 2003 for evaluation and treatment of BCS or splenic-portal thrombosis (PVT), 17 of whom met the modified criteria of the Polycythemia Vera Study Group for PV (Pearson, 2001) (T-PV), whereas the remaining 20 had other causes of the thrombosis or no predisposing factor (T-nPV). For further comparison, 20 healthy blood donors (HC) and 16 PV patients without thrombosis (PV-nT), who were part of a series of 80 patients consecutively diagnosed with PV at the Haematology Department of the Hospital Clínic of Barcelona during the same period, were also studied. Written informed consent was obtained from each individual.

Budd–Chiari syndrome was defined as a hepatic venous outflow obstruction at any level from the small hepatic veins to the junction of the inferior vena cava and the right atrium (Janssen *et al*, 2003). PVT was defined as the presence of endoluminal material and absence of flow in the portal vein access or cavernous transformation of the vein (Condat *et al*, 2001). BCS/PVT was documented by doppler ultrasonography and haemodynamic study.

In BCS/PVT patients, diagnostic work-up included systematic screening for an underlying prothrombotic disorder. The haemostasis screen included the following studies: (1) anti-thrombin, protein C activity, and total and free protein S measurements, determined using commercial kits (Dade Behring, Marburg, Germany; Chromogenix, Milano, Italy; Stago, Asnières, France, respectively); (2) activated protein C resistance, determined in a modified clotting assay after dilution in factor V immunodepleted plasma (Chromogenix); (3) factor V Leiden mutation, assessed by a nucleic acid sequence-based amplification assay (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands); (4) prothrombin gene G20210A mutation, analysed by polymerase chain reaction as reported by Poort *et al* (1996); (5) plasminogen and tissue-type plasminogen activator activity, using chromogenic assays (Chromogenix); (6) lupus anticoagulant, assessed according to the guidelines of the Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (Brandt *et al*, 1995); (7) anticardiolipin antibodies, determined using a standardized enzyme-linked immunosorbent assay (Chesire Diagnostic, Chester, UK) and (8) coagulation factors II, X and V, determined by one-stage clotting assays using factor deficient plasmas (Dade Behring). In patients with low values of protein C, protein S or antithrombin, the ratios of these proteins to the value of (factor II + factor X)/2 were calculated, with deficiencies being considered when the ratio was below 0.7 (Janssen *et al*, 2000).

Haematological study included (1) paroxysmal nocturnal haemoglobinuria immunophenotypic study (with CD55, CD59, CD66, CD24, CD16, CD14 and CD48 antigen

assessment); (2) total red cell mass and plasma volume measurement using ^{51}Cr and ^{125}I ; (3) bone marrow cytogenetic study; (4) a trephine bone marrow biopsy; (5) leucocyte alkaline phosphatase; (6) vitamin B12, ferritin and erythropoietin serum levels; (7) peripheral blood erythroid progenitor culture (with and without addition of erythropoietin) and (8) arterial oxygen saturation determination.

Samples and reagents

Freshly drawn whole blood was obtained in citrate-containing tubes (vacutainer system). All studies were performed in less than 6 h after the samples were obtained. Dihydrorhodamine 123 (DHR) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), a non-fluorescent compound that is transformed into fluorescent rhodamine by the action of ROS, was used for oxidative burst assessment. Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human CD11b monoclonal antibody was used for neutrophil CD11b expression and PE-conjugated mouse anti-CD42b, directed against the platelet glycoprotein Ib, for PNC identification. Irrelevant subclass-matched monoclonal antibodies served as negative controls. Anti-CD11b and anti-CD42b were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). The DNA stain, DRAQ-5 (BioStatus, Shepshed, UK), was used to distinguish intact nucleated cells from non-nucleated, damaged nucleated cells and cell aggregates. *N*-formyl-*L*-methionyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanine (f-MLP) was obtained from Sigma (Madrid, Spain) and used as a neutrophil activator.

Oxidative burst and neutrophil membrane CD11b assays

Oxidative burst was measured by flow cytometry using a no-lyse, no-wash adapted method (Alvarez-Larrán *et al*, 2003). Briefly, whole blood samples containing 0.5×10^6 leucocytes were incubated in a polypropylene tube at 37°C with 0.45 µmol/l DHR. Hank's balanced salt solution was added to the mixture to achieve a final volume of 500 µl. After 5 min, f-MLP was added to induce *in vitro* activation and the samples incubated for 30 min. Samples were read at baseline and after activation with f-MLP following staining with CD11b-PE and DRAQ-5 for 5 min. All assays were performed at 37°C.

Platelet–neutrophil complexes

The PNCs were measured after staining with CD42b-PE and DRAQ-5 at baseline. PNC were identified as CD42b/DRAQ5 double-positive events and the results expressed as a percentage of total nucleated cells. All assays were performed at 37°C.

Flow cytometry acquisition and analysis

Flow cytometry data were collected by FACSCan (BDIS, San Jose, CA, USA). Single laser analysis was carried out using an air-cooled 15 mW argon laser, operating at a 488 nm

wavelength. A threshold was set in the red fluorescence channel (FL-3) to exclude erythrocytes but not lymphocytes with low forward scatter. Sample acquisition was performed at a low-medium rate (150 events/s). Acquisition was stopped at 10 000 total events.

Nucleated cells were labelled with DRAQ-5 and measured through a 670 LP filter (FL-3). A side scatter *versus* FL-3 dot plot was used to distinguish nucleated cells from erythrocytes and debris. For this purpose, an acquisition threshold was set in FL-3; in this first dot plot a region was created to exclude leucocyte aggregates from the analysis. In neutrophil assays, ROS production and membrane CD11b expression were measured in arbitrary units of mean fluorescence intensity (MFI) in fluorescence channels 1 and 2 (FL-1 and FL-2) respectively. Neutrophils were selected in a forward *versus* side scatter dot plot. FL-1 and FL-2 histograms were then obtained from a second gate, selecting CD11b positive events in a FL-2 *versus* side scatter dot plot. To enable the comparison of the results of the present study with those from other laboratories using similar methods, the ratio between baseline CD11b expression in the neutrophils and baseline CD11b expression in the lymphocytes (i.e. in a cell population negative for CD11b) was calculated. For PNC assays CD42b/DRAQ5 double-positive events were selected in a FL-2 *versus* side scatter dot plot and the results were expressed as a percentage of the total nucleated cells.

Statistical methods

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical study, and the haematological parameters were expressed as mean \pm SD and results of CD11b expression, CD11b neutrophil/lymphocyte ratio, DHR and PNC as mean and 95% confidence interval (CI). Differences between groups were analysed with ANOVA followed by *post hoc* analysis using the Student–Newman–Keuls test. For DHR and CD11b, variables were transformed into their logarithms to achieve

normal distribution. Confidence intervals estimated for the log-transformed variables were back-transformed to the original scale. $P < 0.05$ were considered to be statistically significant. Specificity and sensitivity of the variables as possible diagnostic markers for PV were analysed using receiver operating characteristic (ROC) curves, and optimal cut-off points were selected on the basis of the best diagnostic efficiency.

Results

Clinico-haematological data

Table I shows the main clinical and haematological data of patients and controls at the time of study. Eight of the 37 BCS/PVT patients had BCS and the remaining 29 PVT. In six cases, the diagnoses of PV and BCS/PVT were coincidental, the diagnosis of BCS/PVT preceded PV diagnosis in six cases, and in the remaining five the BCS/PVT appeared as a complication of a previously known PV. In the majority of patients the time interval between the thrombotic event and blood sampling was prolonged. Thus, in T-PV patients the median interval between the thrombosis and blood sampling was 76 months (range: 0.3–264), with only three of the 17 patients being studied within 1 month of the thrombotic event. The median interval in T-nPV patients was 128 months (range: 2–360), and none of these 20 patients was studied during the acute phase of the thrombosis. A contributing factor other than PV was found in two of the 17 PV patients with BCS/PVT (protein S deficiency and mutation of the factor V Leiden, one case each), *versus* 12 of the 20 BCS/PVT patients without PV, one of whom had two predisposing factors (previous catheter insertion in the umbilical vein, four cases; C protein deficiency, two cases; antiphospholipid syndrome, three cases; abdominal surgery, three patients and pseudocyst-related chronic pancreatitis, one case).

At the time of study, T-PV patients were receiving acenocumarol (11 cases), hydroxyurea (12 cases), anagrelide and phlebotomy (one patient each), whereas seven of the 20 T-nPV patients received acenocumarol. Among the 16 PV-nT

Table I. Main clinico-haematological data of patients and controls at the time of study.

	T-PV	T-nPV	PV-nT	HC
Age, years [median (range)]	53 (30–70)	40 (18–68)	65 (22–80)*†‡	38 (20–60)
Sex (M/F)	8/9	15/5	8/8	11/9
Haemoglobin (g/dl)	11.9 \pm 2.0	11.5 \pm 2.7	13.9 \pm 1.5 *†	12.9 \pm 1.3
Haematocrit (l/l)	37 \pm 6	35 \pm 7	43 \pm 6*†‡	39 \pm 4
Neutrophils ($\times 10^9/l$)	2.8 \pm 1.3	2.4 \pm 0.9	3.7 \pm 1.8†	2.7 \pm 0.8
Platelets ($\times 10^9/l$)	223 \pm 127	113 \pm 65*†§	237 \pm 108	176 \pm 43

Values are given as mean \pm SD.

T-PV, Budd–Chiari syndrome/portals vein thrombosis (BCS/PVT) secondary to polycythaemia vera (PV); T-nPV, BCS/PVT not associated with PV; PV-nT, PV without thrombosis; HC, healthy controls.

* $P < 0.05$ vs. T-PV; † $P < 0.05$ vs. T-nPV; ‡ $P < 0.05$ vs. HC; § $P < 0.05$ vs. PV-nT (one-way ANOVA test followed by *post hoc* analysis using the Student–Newman–Keuls test paired comparisons).

	T-PV	T-nPV	PV-nT	HC
Baseline CD11b	101 (79–128)*†‡	25 (18–35)	59 (43–80)*‡	34 (25–48)
f-MLP CD11b	190 (151–238)*†‡	55 (41–72)‡	111 (81–153)*	77 (63–95)
Baseline DHR	15 (12–19)‡	10 (8–13)	18 (11–28)‡	7 (6–9)
f-MLP DHR	80 (57–113)*	20 (11–36)	58 (32–104)*	42 (25–72)*
Baseline PNC	55 (49–61)*‡	33 (26–40)	53 (48–59)*‡	39 (34–44)

Values at baseline and following *N*-formyl-*L*-methionyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanine (f-MLP) activation are given as mean and 95% CI. ROS production and CD11b are given in MFI (mean fluorescence intensity) arbitrary units and PNC are expressed as the percentage of the total nucleated cells. For CD11b and dihydrorhodamine (DHR) the values correspond to the back-transformed mean and 95% CI estimated of the log-transformed variable.

* $P < 0.05$ vs. T-nPV; † $P < 0.05$ vs. PV-nT; ‡ $P < 0.05$ vs. HC (one-way ANOVA followed by *post hoc* analysis using the Student–Newman–Keuls test).

patients, nine were receiving hydroxyurea, seven phlebotomy, three radioactive phosphorus, three anagrelide and one aspirin. As can be inferred from the above figures, some patients were receiving more than one therapeutic modality. In five patients the BCS/PVT appeared as a complication of a previously diagnosed PV; all patients had adequate control of the disease and were under treatment at the time of developing the thrombosis (hydroxyurea alone, two cases; phlebotomy alone, two cases and hydroxyurea plus phlebotomy, one patient).

Neutrophil CD11b expression

Significant differences in the baseline neutrophil expression among groups were detected ($P < 0.001$). As can be seen in Table II, PV patients showed significantly higher CD11b expression than healthy controls and individuals with BCS/PVT not secondary to PV, whereas CD11b expression was significantly higher in PV patients with BCS/PVT than in PV patients without thrombosis. Figure 1 depicts the baseline neutrophil CD11b expression of two representative cases of BCS/PVT, one secondary to PV and the other not.

Following f-MLP activation, significant differences were also seen because, although there was an increase in neutrophil CD11b expression in the four groups, patients with BCS/PVT secondary to PV had significantly higher values (Table II).

With regard to neutrophil/lymphocyte CD11b ratio, significant differences between the groups were observed ($P < 0.001$). T-PV patients showed significantly higher values: T-PV: 14.8 (95% CI: 11.9–18.3); T-nPV: 5.5 (95% CI: 4.4–7); PV-nT: 10.1 (95% CI: 7.8–12.9) and HC: 6.3 (95% CI: 4.8–8.3) ($P < 0.05$ in all cases). In turn, PV-nT patients had significantly higher values than healthy controls and T-nPV patients. The neutrophil CD11b expression of patients and controls is shown in Fig 2A and B.

Baseline CD11b neutrophil expression proved to be a valid indicator of the association between BCS/PVT and PV, with the optimal cut-off for the presence of PV being 49.6 MFI units, which showed a sensitivity of 100% (95% CI: 90.5–100) and a

Table II. Oxidative burst, CD11b expression and platelet-neutrophil complexes (PNC) in patients with Budd–Chiari syndrome/portal vein thrombosis (BCS/PVT) secondary to polycythaemia vera (T-PV), BCS/PVT not secondary to polycythaemia vera (T-nPV), patients with polycythaemia vera without thrombosis (PV-nT) and healthy controls (HC).

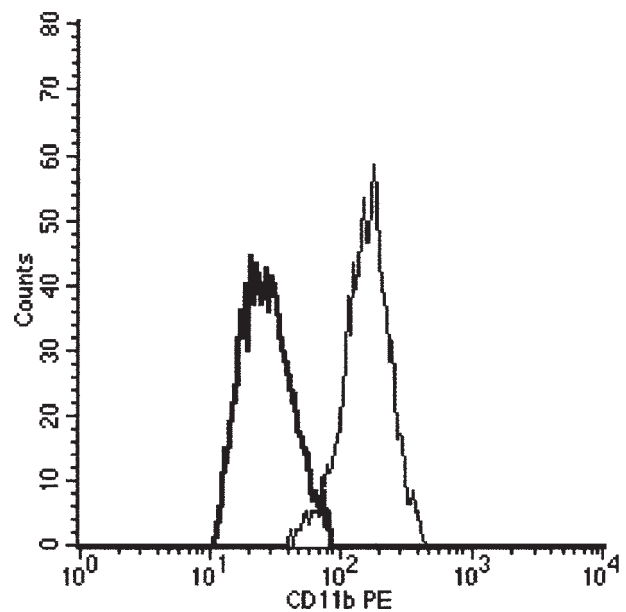


Fig 1. CD11b histograms from two patients with portal vein thrombosis: not secondary to polycythaemia vera (empty histogram) and secondary to polycythaemia vera (shaded histogram).

specificity of 90% (95% CI: 75.6–97.4). For the CD11b ratio, the optimal cut-off was 9.9, with sensitivity of 88.2% (95% CI: 73.1–96.6) and specificity of 94.7% (95% CI: 81.7–99.4).

In PV patients as a whole group, the optimal CD11b cut-off for the association with thrombosis was 63.8 MFI units, with sensitivity of 88.2% (95% CI: 71.9–96.9) and specificity of 60% (95% CI: 41.2–76.8), whereas the optimal cut-off for the neutrophil/lymphocyte CD11b ratio was 12, with 70.6% sensitivity (CI: 51.9–85.3) and 73.3% specificity (CI 95%: 54.8–87.3).

ROS production

Table II shows the ROS production of the neutrophils (as expressed in rhodamine MFI units) at baseline and after f-MLP

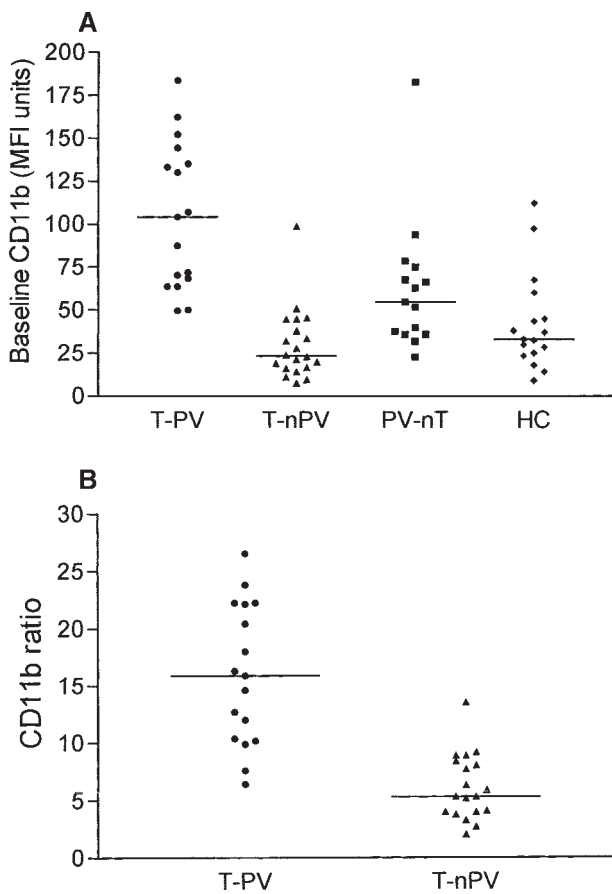


Fig 2. Baseline flow cytometry quantification of CD11b neutrophil expression in mean fluorescence intensity (MFI) arbitrary units (A), and neutrophil/lymphocyte CD11b ratio (B). T-PV, patients with Budd–Chiari syndrome/portal vein thrombosis (BCS/PVT) secondary to PV; T-nPV, BCS/PVT not associated with PV; PV-nT, PV without thrombosis; HC, healthy controls. The horizontal lines represent the median value for each group.

activation. As can be seen in Fig 3, PV patients overall had significantly higher values at baseline than healthy controls and patients with BCS/PVT not secondary to PV. Following f-MLP activation, ROS production increased in all groups, with the T-nPV group showing significantly lower values (Table II). No differences were observed in the ROS production between PV patients with and without thrombosis.

Platelet–neutrophil complexes

Polycythaemia vera patients had a higher mean percentage of circulating PNC than T-nPV individuals or the healthy controls (Table II and Fig 4). However, no difference was observed between PV patients with and without thrombosis.

Discussion

Thrombosis is the main cause of morbidity and mortality in PV patients (Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995).

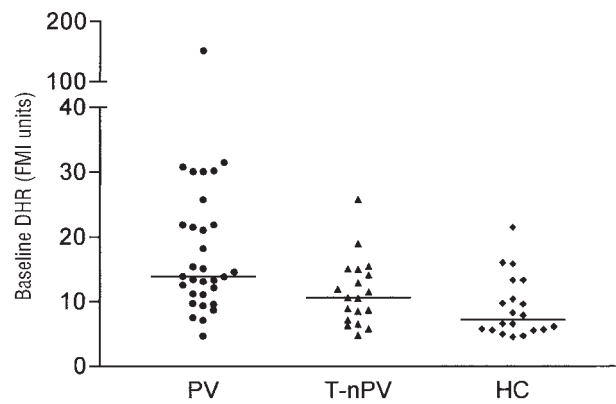


Fig 3. Oxidative burst measurement by flow cytometry. Baseline neutrophil reactive oxygen species (ROS) production is expressed in mean fluorescence intensity (MFI) arbitrary units of dihydrorhodamine (DHR). PV, PV patients; T-nPV, patients with BCS/PVT not associated with PV; HC, healthy controls. The horizontal lines represent the median value for each group. $P < 0.05$ for PV vs. T-nPV and PV vs. HC.

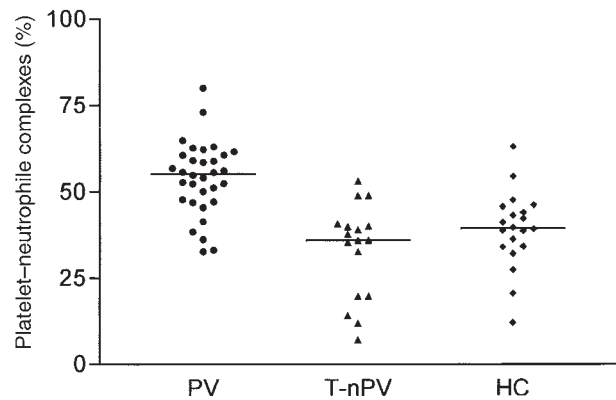


Fig 4. Flow cytometry quantification of circulating platelet–neutrophil complexes (PNC). The results are expressed as the percentage of the total nucleated cells. PV, PV patients; T-nPV, patients with BCS/PVT not associated with PV; HC, healthy controls. The horizontal lines represent the median value for each group. $P < 0.05$ for PV vs. T-nPV and PV vs. HC.

BCS/PVT are severe thrombotic complications of PV and this disease represents the first cause of such thromboses in Western countries (Valla *et al*, 1988; Kudo, 1996; Perelló *et al*, 2002). In patients with abdominal vein thrombosis, diagnosis of PV can be difficult, because the disease features can be masked by hypersplenism, dilution of the blood cells in an increased plasma volume and gastrointestinal bleeding. In this sense, it cannot be excluded that some patients of the present series had more severe BCS/PVT, making the diagnosis of PV more difficult to establish, because of the fact that our centre is the reference centre for abdominal thrombosis in Spain. Erythroid colony culture and erythropoietin serum levels have contributed to better identification of hidden PV. However, controversy remains on their diagnostic value and therefore

new laboratory parameters for PV screening are needed (Klippel *et al*, 2002).

In PV patients, thrombosis can be attributed to a number of factors, including hyperviscosity caused by the increased red cell mass (Spivak, 2002), functional abnormalities of the platelets, thrombocytosis (McMullin *et al*, 2003) and coexistent coagulation disorders (Hoffman *et al*, 1999), as occurred in some patients of the present series. Based on the pluripotent haemopoietic stem cell origin of PV (Adamson *et al*, 1976), a role for granulocytes in the pathogenesis of the thrombosis in PV has been postulated (Falanga *et al*, 2000). PV patients show an activated neutrophil phenotype, as demonstrated by enhanced expression of the CD11b antigen and the cellular and plasma elastase. CD11b is a member of the $\beta 2$ integrin family, responsible for firm attachment of the neutrophils to endothelial counterligands (e.g. the intercellular adhesion molecule 1 or ICAM-1), endothelial associated extracellular matrix proteins, glycosaminoglycans and platelet glycoprotein Ib (Smith *et al*, 1989; Diamond *et al*, 1995; Languino *et al*, 1995; Simon *et al*, 2000). Upon activation, neutrophils upregulate the membrane CD11b expression, promoting their increased adherence to the endothelium and phagocytosis (McEver, 2001). Because of this, enhanced CD11b expression is considered a marker of neutrophil activation.

Abdominal vessel thrombosis was chosen for the present study to take advantage of the high number of such patients seen in our Hepatic Haemodynamic Unit, which is the reference centre for this disease in Spain. In confirmation of previous reports (Westwood *et al*, 1995; Falanga *et al*, 2000; Burgaleta *et al*, 2002), we found an increased neutrophil CD11b expression in PV patients, mainly in those with BCS/VPT, indicating neutrophil activation. As in the above studies, such an increase was registered at baseline. However, patients with BCS/PVT secondary to PV also showed higher CD11b expression following f-MLP incubation, which is in contrast with the observation of Falanga *et al* (2000) in a group of 34 PV patients, of whom only two had a history of thrombosis. The differences in CD11b expression were highly significant when patients with BCS/PVT associated with PV were compared with healthy controls and individuals with BCS/PVT not secondary to PV. Of note, some patients in the present series developed the thromboses while their PV was well controlled under appropriate treatment, as has previously been reported for patients with myeloproliferative disorders (Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995). The fact that the ROC curves obtained using the CD11b expression in PV patients with or without thrombosis showed high specificity and sensitivity would support CD11b expression as a good indicator of the association between PV and thrombosis. However, whether CD11b could identify those PV patients at higher risk of thrombosis remains to be confirmed by prospective studies.

The assessment of CD11b expression by MFI arbitrary units has some limitations for its routine application, with the main disadvantage being that the establishment of a CD11b cut-off

in MFI units could hamper interlaboratory reproducibility. To circumvent such limitation, we designed a simple index resulting from the ratio between the baseline CD11b expression in the neutrophils and lymphocytes. Although CD11b expression is a marker of neutrophil activation that can be altered by various stimuli (McEver, 2001), the methods herein employed minimize the artefacts derived from sample manipulation, as they do not involve washing and lysis and are fast and easy to perform.

With regard to the validity of CD11b neutrophil expression and the neutrophil/lymphocyte CD11b ratio as possible tools for the identification of underlying PV in patients with BCS/PVT, the results of the present study are not probably sufficient to unequivocally support such a recommendation. Nevertheless, it must be pointed out that these two parameters demonstrated high specificity and sensitivity in this sense, because 100% of patients with BCS/PVT secondary to PV showed a baseline neutrophil CD11b expression ≥ 49.6 MFI units and 88% had CD11b neutrophil/lymphocyte ratios ≥ 9.9 , whereas only two and one of the 20 patients with BCS/PVT not secondary to PV had CD11b baseline expression and CD11b ratios over the above cut-off values, respectively.

The results of ROS production in patients with chronic myeloproliferative disorders have been controversial (Samuelson & Berg, 1991; Iki *et al*, 1997; Burgaleta *et al*, 2002). In the present study, baseline ROS production in PV was higher than in the control groups, but no significant differences were observed between PV patients with and without thrombosis.

There is increasing evidence that platelets can initiate and propagate inflammation and thrombosis by interacting with granulocytes (Evangelista *et al*, 1996; Ott *et al*, 1996; Weyrich *et al*, 1996). In the present study, a higher percentage of PNC was observed in the peripheral blood of PV patients, but no differences were found between PV patients with or without thrombosis. Although this finding suggests a role for platelets and neutrophils in the thrombogenesis, the above marker does not seem to be an adequate indicator of the thrombotic risk. The fact that patients with BCS/PVT not secondary to PV showed the lowest PNC values could be explained by lower platelet counts in these cases.

In conclusion, neutrophil CD11b expression is markedly increased in patients with abdominal vein thrombosis secondary to PV and could be of use in screening for underlying PV in individuals with this complication. Further studies are required to ascertain whether neutrophil CD11b expression could identify those PV patients at greater risk of thrombosis.

Acknowledgments

We thank Leonardo Carreño and Rosa Sáez for their help in the study. Supported by grants FIS 02/0692 from the Spanish Ministry of Health, CR-02 from the José Carreras International Leukemia Foundation and C03/02 from the Instituto de Salud Carlos III.

References

- Adamson, J.W., Fialkow, P.J., Murphy, S., Prchal, J.F. & Steinman, L. (1976) Polycythemia vera: stem cell and probable clonal origin of the disease. *New England Journal of Medicine*, **295**, 913–916.
- Alvarez-Larrán, A., Petriz, J., Martínez, A., Sanz, C. & Pereira, A. (2003) Plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura induces activation of human monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *British Journal of Haematology*, **120**, 129–134.
- Brandt, J.T., Triplett, Da., Alving, B. & Scharrer, I. (1995) Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation of the ISTH. *Thrombosis and Haemostasis*, **74**, 1185–1190.
- Burgaleta, C., González, N. & César, J. (2002) Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematologica*, **108**, 23–28.
- Condat, B., Pessione, F., Hillaire, S., Denninger, M.H., Guillin, M.C., Poliquin, M., Hadengue, A., Erlinger, S. & Valla, D. (2001) Current outcome of portal vein thrombosis in adults: risk and benefit of anticoagulant therapy. *Gastroenterology*, **120**, 490–497.
- Diamond, M.S., Alon, R., Parkos, C.A., Quinn, M.T. & Springer, T.A. (1995) Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Cell Biology*, **130**, 1473–1482.
- Evangelista, V., Manarini, S., Rotondo, S., Martelli, N., Polischuk, R., McGregor, J.L., de Gaetano, G. & Cerletti, C. (1996) Platelet/polymorphonuclear interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the β_2 integrin CD11b/CD18. *Blood*, **88**, 4183–4194.
- Falanga, A., Marchetti, M., Evangelista, V., Vignoli, A., Licini, M., Balicco, M., Manarini, S., Finazzi, G., Cerletti, C. & Barbui, T. (2000) Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, **96**, 4261–4266.
- Gruppo Italiano Studio Policitemia (1995) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Annals of Internal Medicine*, **123**, 656–664.
- Hoffman, R., Nimer, A., Lanir, N., Brenner, B. & Baruch, Y. (1999) Budd–Chiari syndrome associated with factor V Leiden mutation: a report of six patients. *Liver Transpl Surg*, **5**, 96–100.
- Iki, S., You, A., Yagisawa, M., Inuo, E.K., Inoue, Y., Usuki, K., Urabe, A., Suzuki, K., Kitagawa, S., Togawa, A. & Takaku, F. (1997) 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. *Experimental Hematology*, **25**, 26–33.
- Janssen, H.L., Meinardi, J.R., Vlegaar, F.P., van Uum, S.H., Haagsma, E.B., van Der Meer, F.J., van Hattum, J., Chamuleau, R.A., Adang, R.P., Vandenbroucke, J.P., van Hoek, B. & Rosendaal, F.R. (2000) Factor V Leiden mutation, prothrombin gene mutation and deficiencies in coagulation inhibitors associated with Budd–Chiari Syndrome and portal vein thrombosis: results of a case control study. *Blood*, **96**, 2364–2368.
- Janssen, H.L.A., Garcia-Pagán, J.C., Elias, E., Mentha, G., Hadengue, A. & Valla, D.C. (2003) Budd–Chiari syndrome: a review by an expert panel. *Journal of Hepatology*, **38**, 364–373.
- Jensen, M.K., de Nully, P., Brown, P., Lund, B.V., Nielsen, O.J. & Hasselbalch, H.C. (2001) Increased circulating platelet-leukocytes aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *European Journal of Haematology*, **66**, 143–151.
- Klippel, S., Strunck, E., Busse, C.E., Behringer, D. & Pahl, H.L. (2002) Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood*, **100**, 2441–2448.
- Kudo, M. (1996) Budd–Chiari syndrome and myeloproliferative disorder. *Internal Medicine*, **35**, 837–838.
- Languino, L.R., Duperray, A., Joganic, K.J., Fornaro, M., Thornton, G.B. & Altieri, D.C. (1995) Regulation of leukocyte-endothelial interactions and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 7734–7738.
- McEver, R.P. (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, **86**, 746–756.
- McMullin, M.F., Bareford, D., Craig, J., Green, A.R., Harrison, C., Oscier, D.G. & Reilly, J.T. (2003) The optimal management of polycythemia vera. *British Journal of Haematology*, **120**, 543–545.
- Ott, I., Neumann, F.J., Gawaz, M., Schmitt, M. & Schomig, A. (1996) Increased neutrophil–platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*, **94**, 1239–1246.
- Pearson, T.C. (2001) Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Seminars in Hematology*, **1**(Suppl. 2), 21–24.
- Perelló, A., García-Pagán, J.C., Gilabert, R., Suárez, Y., Moitinho, E., Cervantes, F., Reverter, J.C., Escorsell, A., Bosch, J. & Rodés, J. (2002) TIPS is a useful long-term derivative therapy for patients with Budd–Chiari syndrome uncontrolled by medical therapy. *Hepatology*, **35**, 132–139.
- Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H. & Bertina, R.M. (1996) A common genetic variation in the 3′-untranslated region of the prothrombin gene is associated with plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, **88**, 3698–3703.
- Samuelson, J. & Berg, A. (1991) Further studies of the defective stimulus–response coupling for the oxidative burst in neutrophils in polycythemia vera. *European Journal of Haematology*, **47**, 239–245.
- Simon, D.I., Chen, Z., Xu, H., Li, Ch., Dong, J., McIntire, L., Ballantyne, Ch., Zhang, L., Furman, M.I., Berndt, M.C. & López, J. (2000) Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b-CD18). *Journal of Experimental Medicine*, **192**, 193–204.
- Smith, C.W., Marlin, S.D., Rothlein, R., Toman, C. & Anderson, D.C. (1989) Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, **83**, 2008–2017.
- Spivak, J.L. (2002) Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. *Blood*, **100**, 4272–4290.
- Valla, D., Casadevall, N., Huisse, M.G., Tulliez, M., Grange, J.D., Muller, O., Binda, T., Varet, B., Rueff, B. & Benhamou, J.P. (1988) Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology*, **94**, 1063–1069.
- Westwood, N.B., Copson, E.R., Page, L.A., Mire-Sluis, A.R., Brown, K.A. & Pearson, T.C. (1995) Activated phenotype in neutrophils and monocytes from patients with primary proliferative polycythemia. *Journal of Clinical Pathology*, **48**, 525–530.
- Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M. & Zimmerman, G.A. (1996) Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 1525–1534.

3.2. TRABAJO 2

Incidencia de trombosis y factores de riesgo para esta complicación en la mielofibrosis primaria: análisis de una serie de 155 pacientes de una sola institución.

Cervantes F, **Alvarez-Larrán A**, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia*, 2006;20:55-60.

3.2.1. RESUMEN

La policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP) son síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Filadelfia negativos que comparten ciertas características clínicas y biológicas. En este sentido, el reciente descubrimiento de la mutación V617F del gen JAK2 en el 95% de los pacientes con PV y en la mitad de los enfermos con TE y MFP ha venido a apoyar la agrupación de estas tres entidades en una posición nosológica común.

Desde el punto de vista clínico, dos de estos SMPC, la PV y la TE, se asocian a un riesgo aumentado de trombosis, siendo las complicaciones trombóticas la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Así, en torno al 40% de los pacientes con PV y al 30% de los enfermos con TE presentan trombosis, bien en el momento del diagnóstico o a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Con respecto a la MFP, no existen trabajos realizados en series amplias en los que se haya estudiado de forma específica la incidencia real de trombosis y los factores de riesgo asociados a la aparición de dicha complicación. A partir de estudios realizados en series de escaso tamaño y de la observación de que los pacientes con MFP podían presentar trombosis tras la esplenectomía, algunos autores han sugerido que los pacientes con MFP podrían tener un mayor riesgo de trombosis. Sin embargo, el aumento en la incidencia de trombosis podría estar en relación con la edad avanzada de la mayoría de los pacientes con MFP, por lo que podría no existir una diferencia real con respecto a la población general. Por otro lado, se ha referido en la MFP que la presencia de la mutación V617F de JAK2 se asocia a un mayor

riesgo trombótico, lo cual sugiere que, al igual que en la PV y la TE, los mecanismos involucrados en la patogénesis de la trombosis descritos en estas enfermedades también podrían intervenir en la MFP.

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia y el tipo de trombosis en la MFP, así como los factores asociados a su aparición. Para ello se revisaron las historias clínicas de 155 pacientes diagnosticados de forma consecutiva en el servicio de Hematología del Hospital Clínic. Con un seguimiento mediano de 4,2 años, se observaron un total de 31 complicaciones trombóticas (19 arteriales y 12 venosas) en 18 pacientes. En 6 enfermos la trombosis fue simultánea al diagnóstico de MFP o la precedió en pocos meses, mientras que en 14 la trombosis constituyó una complicación que apareció en el curso evolutivo de la enfermedad. Con respecto a la población general, los pacientes con MFP presentaron un riesgo significativamente incrementado de presentar trombosis venosa profunda y accidentes vasculares cerebrales. La trombocitosis, la presencia de factores de riesgo cardiovascular y la fase celular de la mielofibrosis fueron las variables que se asociaron de forma significativa a un riesgo mayor de trombosis en el análisis multivariado. La probabilidad actuarial de trombosis a los 5 años fue del 9,6% para la serie global, 19,4% para los pacientes con plaquetas $> 450 \times 10^9/L$, 17,4% para los pacientes con algún factor de riesgo vascular y 14,9% para los pacientes con mielofibrosis en fase celular. Estos resultados indican que los pacientes con MFP presentan un riesgo incrementado de desarrollar complicaciones trombóticas, siendo el riesgo más alto en las formas hiperproliferativas de la enfermedad y en los pacientes con factores de riesgo cardiovascular.

ORIGINAL ARTICLE

Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution

F Cervantes, A Alvarez-Larrán, E Arellano-Rodrigo, M Granell, A Domingo and E Montserrat

Hematology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Thrombosis is a frequent complication of polycythemia vera and essential thrombocythemia, but its incidence and predisposing factors in idiopathic myelofibrosis (IM) are unknown. In 18 (11.6%) of 155 patients diagnosed with IM in a single institution, 31 thrombotic events (19 arterial, 12 venous) were registered after a mean follow-up of 4.2 (s.d.: 4.5) years. In six patients, the thrombosis was simultaneous to or appeared a few months before IM diagnosis and 14 had one or more thrombotic episodes. When compared with the general population, a significant increase was observed in the incidence of venous thrombosis (odds ratio 17.5, 95% confidence interval: 10.3–31.4). At multivariate analysis, the initial variables associated with an increased risk of thrombosis were thrombocytosis (platelets $>450 \times 10^9/l$, $P=0.001$), presence of one cardiovascular risk factor (arterial hypertension, smoking, hypercholesterolemia, or diabetes, $P=0.003$), cellular phase of myelofibrosis ($P=0.005$), and Hb >11 g/dl ($P=0.02$). Considering post-diagnosis events, the 5-year thrombosis-free survival probability was 90.4% in the series, 80.6% for patients with platelets $>450 \times 10^9/l$, 82.6% for patients with one cardiovascular risk factor, and 85.1% for those in cellular phase. These results indicate an increased thrombotic risk for IM patients with hyperproliferative features and/or coexistent cardiovascular risk factors.

Leukemia (2006) 20, 55–60. doi:10.1038/sj.leu.2404048;
published online 24 November 2005

Keywords: idiopathic myelofibrosis; myelofibrosis with myeloid metaplasia; thrombosis

Introduction

The classical Ph-negative chronic myeloproliferative disorders (MPDs) are a group of heterogeneous diseases of clonal origin arising in a pluripotent hemopoietic stem cell, which includes polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and idiopathic myelofibrosis (IM). From the clinical point of view, two of them, PV and ET, are associated with an increased frequency of thrombosis, with this complication representing the main cause of morbidity and mortality in both diseases. Thus, more than 40% of PV patients develop thrombotic complications prior to diagnosis, at presentation or during their evolution,^{1,2} and the proportion is up to 30% in ET patients.^{3–5} With regard to IM, the most infrequent of the MPDs and the one with a poorer prognosis, there have been isolated reports of small series of patients, suggesting an increased occurrence of thrombosis,^{6,7} whereas an excess of thrombotic events has also been registered in these patients following splenectomy.^{8–11} However, no information is available on the overall frequency

of thrombosis in IM and, therefore, it is not known whether patients with this disease actually have an increased tendency to develop such complication.

The primary aim of the present study was to determine the frequency and type of thrombosis in IM patients and the possible factors associated with the appearance of this complication. For this purpose, 155 patients consecutively diagnosed with IM and followed up at the same institution during their whole clinical course were analyzed.

Patients and methods

Patient population and diagnostic criteria

Between 1972 and 2005, 163 patients were consecutively diagnosed with IM at the Hematology Department of the Hospital Clínic of Barcelona, Spain. In eight of them, information on the follow-up was incomplete, since they had been mostly controlled in other hospitals after the initial diagnosis. The analysis was therefore restricted to the 155 patients who were followed up at our institution along their whole clinical course. In order to avoid possible biases, patients with post-polycythemic¹² or post-thrombocytopenic myelofibrosis¹³ were not considered. The same applied to patients with the so-called 'pre-fibrotic' form of myelofibrosis.¹⁴ The diagnosis of IM was based on the criteria established by the Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.¹⁵ Bone marrow histology was evaluated according to the criteria by Lennert *et al*,¹⁶ in which three myelofibrosis subtypes are considered: cellular or MF/C phase (myelofibrosis with increased hemopoietic cellularity and reticulin fibrosis), MF/O– phase (myelofibrosis with reticulin and collagen fibrosis but no new bone formation), and osteosclerotic or MF/O+ phase (decreased hemopoietic cellularity, marked reticulin and collagen fibrosis, and osteosclerosis). The karyotype of bone marrow or unstimulated peripheral blood cells was analyzed whenever assessable metaphases could be obtained.

Treatment

Treatment was heterogeneous, with the therapeutic choice being primarily based on the patients' age and clinicohematological characteristics. It consisted of either a wait-and-see approach or supportive therapy exclusively in 46 patients. The remaining 109 patients received one or more of the following therapies: hydroxyurea (44 cases), androgens (36 cases: danazol, $n=33$; oxymetholone, $n=3$), erythropoietin (20 patients), prednisone (15 patients), 6-mercaptopurine (10 patients), anagrelide (five patients), interferon alpha (five patients), busulfan (four patients), 1,25-dihydroxy-vitamin D (two patients), and ³²P, cyclophosphamide, and cyclosporin A

Correspondence: Dr F Cervantes, Hematology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: fcervan@clinic.ub.es

Received 21 July 2005; revised 17 October 2005; accepted 24 October 2005; published online 24 November 2005

(one patient each). As a rule, platelet-lowering agents (mostly hydroxyurea) were administered to patients with thrombocytosis. In all, 21 patients underwent splenectomy, usually because of massive symptomatic splenomegaly or refractory anemia, and three received splenic irradiation. Allogeneic stem cell transplantation was performed in four patients.

Vascular complications

For the purpose of the present study, only major vascular events, defined according to the International Classification of Diseases (Ninth Revision), were considered. Arterial thromboses included: stroke, transient ischemic attacks (TIA), retinal artery occlusion, coronary arterial disease (angina pectoris or myocardial infarction), and peripheral arterial disease (intermittent claudication and thromboembolism of the leg arteries). Venous thromboses included: cerebral venous sinus thrombosis, deep-vein thrombosis, pulmonary thromboembolism, Budd–Chiari syndrome (BCS), and portal vein thrombosis (PVT). Minor occlusive events, such as erythromelalgia and superficial thrombophlebitis of the extremities, were not included in the analysis.

Acute myocardial infarction was defined by at least two of the following findings: chest pain of typical intensity and duration, ST-segment elevation or depression ≥ 1 mm in any limb lead on electrocardiography, ≥ 2 mm in any precordial lead or both, and at least doubling of the serum levels of the cardiac enzymes. Peripheral artery disease was diagnosed by angiography. Diagnosis of stroke required signs or symptoms of a neurologic deficit with sudden onset and a duration of more than 24 h, and it was confirmed by computed tomography (CT) since 1983 or magnetic resonance imaging since 1993. A TIA was defined as the abrupt onset of unilateral motor or sensory disturbances, speech defects, homonymous hemianopsia, constructional apraxia, or transient monocular blindness that resolved completely in less than 24 h. Pulmonary embolism was diagnosed by a positive angiogram or ventilation-perfusion scan or a CT scan indicating a high probability of such complication. Deep venous thrombosis was diagnosed by phlebography or doppler ultrasonography. BCS was defined as a hepatic venous outflow obstruction at any level from the small hepatic veins to the junction of the inferior vena cava and the right atrium, and PVT as the presence of endoluminal material with absence of flow in the portal vein access or cavernous transformation of the vein. Both BCS and PVT were documented by doppler ultrasonography and hemodynamic study.

Statistical methods

In each patient, the major thrombotic events occurring within the year preceding diagnosis of IM, at disease presentation or after diagnosis (and, in these cases, the time lapse between diagnosis and the vascular event), were recorded. In order to compare the rate of major thrombotic events in the series with the one in the general population, patients were distributed by age groups according to the distribution employed in the studies that were used for the comparison, which included peripheral arterial disease,¹⁷ stroke,¹⁸ venous thrombosis,¹⁹ and coronary heart disease.²⁰ For each comparison, a ratio of the observed to the expected incidence of thrombotic events^{17–20} and a 95% confidence interval (CI) was calculated assuming a Poisson distribution. The following initial variables were analyzed for their possible association with the occurrence of thrombosis: age, gender, previous history of thrombosis, presence of vascular risk factors (arterial hypertension, current cigarette

smoking, hypercholesterolemia, and diabetes mellitus), assessed as previously described,⁴ spleen size, platelet count, Hb level, WBC count, absolute neutrophil and monocyte counts, serum levels of cholesterol, LDH and acid uric, and histologic phase of myelofibrosis in the bone marrow biopsy. Two evolutive variables (namely, splenectomy and cytolytic treatment) were also assessed for their influence on the occurrence of thrombosis. The *t*-test, the Mann–Whitney *U*-test and the χ^2 test were employed to select the significant factors at the univariate level. Subsequently, in order to identify the independent predictors of thrombosis, these factors were included in a multivariate logistic regression analysis. Three variables previously described as having a possible influence on the appearance of thrombosis (i.e., age, sex, and previous splenectomy), and that were not selected as independent predictors, were individually forced into the final model, and relevant changes in the regression coefficients of the independent predictors were excluded. The contribution of each significant variable to the risk of thrombosis was estimated by the adjusted odds ratio with its 95% CI. The thrombotic risk during follow-up was assessed with the Kaplan–Meier method, followed by the log-rank test. Variables attaining a significant level at the univariate analysis were included in a Cox proportional hazards model for assessing their independent association with thrombosis. Significance was considered for *P*-values < 0.05 . The statistical analysis was performed using the SPSS 10.0 package (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Table 1 summarizes the main clinical and laboratory features of the 155 patients at IM presentation. Distribution of the cardiovascular risk factors was as follows: 42 patients were current smokers, 23 had arterial hypertension, 16 diabetes mellitus, and 12 serum cholesterol levels higher than 220 mg/dl. In all, 74 patients had one cardiovascular risk factor, 18 had two factors, and one had three factors. With regard to histological distribution, 65 cases (42.5%) were classified as corresponding to the cellular phase of myelofibrosis, 66 (43.1%) to the MF/O-phase, and 22 (14.4%) to the osteosclerotic phase. Out of the 83 patients with assessable metaphases, 20 (24%) showed clonal chromosomal abnormalities, the most frequent ones being del 20q (four cases), trisomy 8 (three cases), and del 13q and -11 (two cases each).

Table 1 Main clinicohematological characteristics of the 155 patients at diagnosis of IM

Feature	
Age (years) ^a	65 (17–89)
Gender (M/F)	97/58
Constitutional symptoms	30%
Spleen size (cm) ^b	
≤ 6 cm	48%
> 6 cm	52%
Hb (g/dl)	10.3 (3.8–16)
WBC count ($\times 10^9/l$)	9 (0.8–70)
Platelet count ($\times 10^9/l$)	248 (10–1900)

^aMedian (range); M: male; F: female.

^bBelow costal margin.

At the time of the analysis, 104 patients had died. The median survival for the series was 4.1 (95% CI: 2.9–5.3) years. When patients were distributed into two groups according to the diagnostic period (from 1972 to 1990 and from 1991 to 2005), median survival of the 65 patients in the first group was 4.1 years (95% CI: 3.1–6.8), versus 3.9 years (95% CI: 2.1–5.3) for the 90 patients in the second group, with the difference being not significant. After a mean follow-up of 4.2 (s.d.: 4.5) years, a total of 31 thrombotic events were registered in 18 patients (11.6% of the series). In six patients, the thrombosis occurred within the year prior to diagnosis (four cases) or at disease presentation (two cases). Five of them had high platelet counts. In all, 14 patients (two of whom had a previous history of thrombosis) developed one or more thrombotic episodes during their evolution. Table 2 shows the main clinicohematological data at the time of appearance of the first thrombotic complication in the 18 patients with thrombosis. Table 3 summarizes the type and number of thrombotic events. As can be seen, 19 thromboses were arterial and 12 venous. Of the four subgroups of thrombosis considered (i.e., venous thrombosis, stroke, peripheral arterial disease, and coronary heart disease), venous thrombosis was the most frequent one. With regard to the site of the thrombosis, the cerebrovascular and the peripheral arteries were the territories most frequently involved. In five patients the thrombosis represented the cause of death, including BCS (two patients), and PVT, stroke, and PTE (one case each).

When compared with data from the general population, IM patients showed a significant increase in the incidence of venous thromboses (odds ratio 17.5, 95% CI: 10.3–31.4). The incidence of stroke was also increased (odds ratio 5.7, 95% CI: 2.1–15.3), but no increase in coronary and peripheral arterial disease was noted.

As shown in Table 4, at univariate analysis, five initial variables (i.e., thrombocytosis $>450 \times 10^9/l$, cellular phase of myelofibrosis, presence of any cardiovascular risk factor, Hb >11 g/dl, and cholesterol levels >220 mg/dl) were associated with an increased incidence of thrombosis. When they were included in the multivariate analysis together with age, gender, and splenectomy, only thrombocytosis (platelet counts

$>450 \times 10^9/l$), cellular phase, presence of any cardiovascular risk factor, and Hb >11 g/dl retained their predictive value for the occurrence of major vascular complications (Table 5). Of the 21 patients submitted to splenectomy, three had thrombotic complications shortly after the procedure, including two with pulmonary thromboembolism and one with recurrent thromboses in several territories (BCS, portal vein, deep vein, and cavernous sinus thrombosis).

Considering only the thrombotic events that occurred after diagnosis of IM, thrombosis-free survival probability at 5 years was 90.4% for the overall series (Figure 1). At univariate

Table 3 Type and number of major thrombotic events in 155 patients with idiopathic myelofibrosis

Type of event	No. of patients
Transient ischemic attack	4
Stroke	3
Central retinal artery thrombosis	1
Coronary arterial disease	4
Peripheral arterial disease	7
Budd–Chiari syndrome	2
Portal vein thrombosis	4
Deep vein thrombosis	3
Pulmonary thromboembolism	2
Cerebral venous sinus thrombosis	1

Table 4 Initial variables associated with the occurrence of thrombosis at the univariate analysis in 155 patients with idiopathic myelofibrosis

Variable	P-value
Platelets $>450 \times 10^9/l$	<0.001
Marrow cellular phase	0.001
Hb >11 g/l	0.01
Presence of any cardiovascular risk factor	0.01
Serum cholesterol >220 mg/dl	0.04

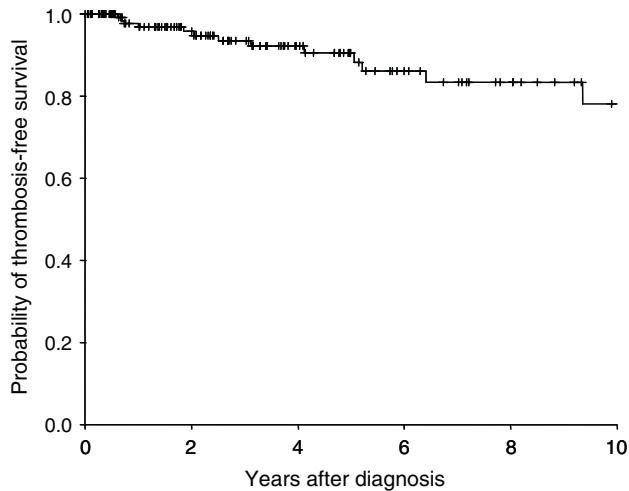
Table 2 Main clinicohematological data at the time of the first thrombotic event in 18 patients with IM

Patient no. ^a	Age/sex	Cardiovascular risk factors	Hb (g/dl)	WBC ($\times 10^9/l$)	Platelets ($\times 10^9/l$)	Histologic phase of IM	Type of event
1	72/M	Yes	8	6.2	518	C	CAD
2	68/F	Yes	8.8	11.3	1250	C	DVT
3	84/M	Yes	10.2	9	127	C	Stroke
4	59/M	Yes	11.9	8.8	967	C	TIA
5	67/F	No	14	23	1900	C	PTE
6	28/F	No	13	9	581	C	BCS
7	57/M	Yes	16	22	257	C	TIA
8	63/M	No	12	11	301	C	PAD
9	34/M	Yes	14.2	6.6	225	C	PVT
10	76/M	Yes	12	3.4	170	C	CAD
11	85/M	Yes	9.1	5.6	481	O–	TIA
12	67/M	Yes	10.3	14.4	357	C	PAD
13	41/M	Yes	14.3	19	743	C	CRAT
14	57/F	No	9	18	490	O–	PVT
15	59/M	Yes	11	17	554	O–	PVT
16	79/F	Yes	12.5	8.2	230	O–	PAD
17	82/F	No	10.9	23	900	C	TIA
18	78/M	Yes	9.5	6.9	350	C	PAD

^aIn patients 1–6, the thrombosis occurred shortly before or at diagnosis of IM. M: male; F: female; C: cellular phase; O–: nonosteosclerotic phase; CAD: coronary arterial disease; DVT: deep vein thrombosis; TIA: transient ischemic attack; PTE: pulmonary thromboembolism; BCS: Budd–Chiari syndrome; PAD: peripheral arterial disease; PVT: portal vein thrombosis; CRAT: central retinal artery thrombosis.

Table 5 Multivariate analysis of the prognostic factors for the appearance of thrombosis in 155 patients with IM

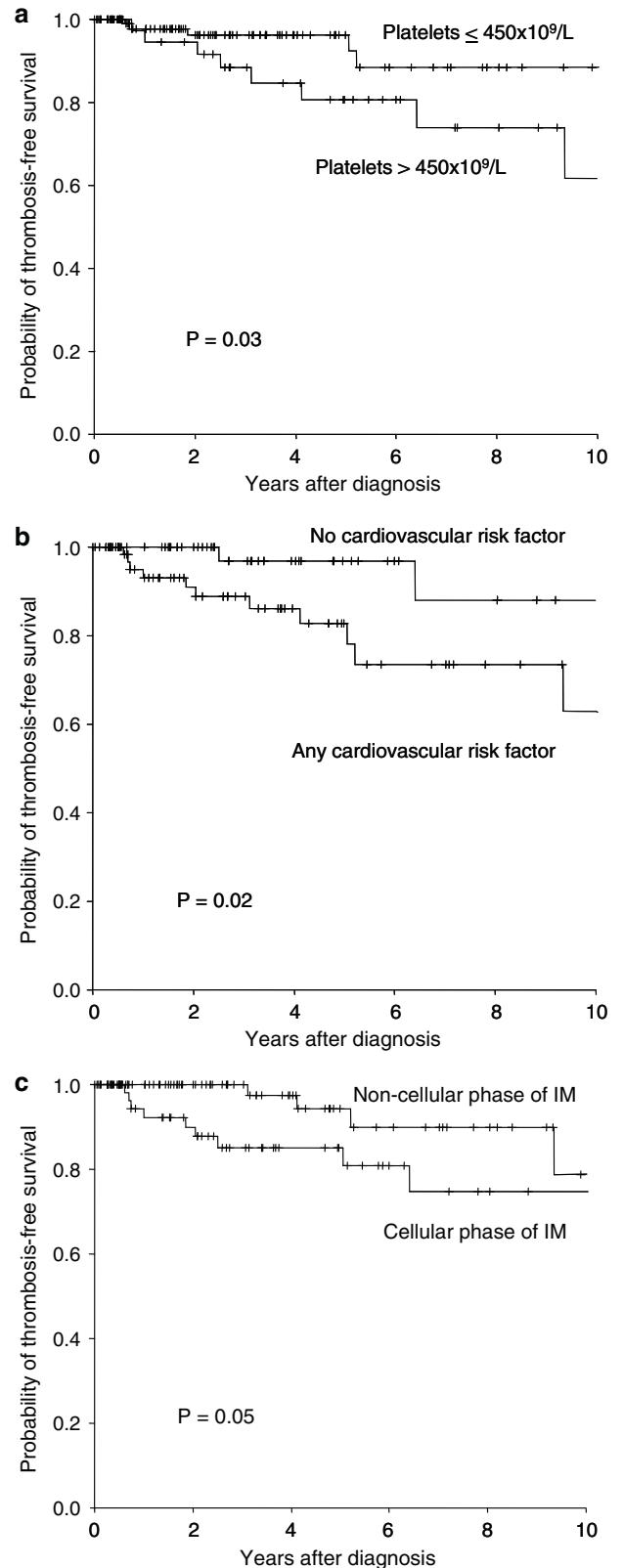
Variable	Odds ratio (95% CI)	P-value
Platelets $> 450 \times 10^9/l$	9.7 (2.4–39)	0.001
Any cardiovascular risk factor	14.9 (2.5–87)	0.003
Marrow cellular phase	7.2 (1.8–28.1)	0.005
Hb > 11 g/dl	5.1 (1.2–20.7)	0.005

**Figure 1** Probability of thrombosis-free survival in 155 patients with IM.

analysis, the prognostic factors for the appearance of thrombosis were the presence of at least one cardiovascular risk factor ($P=0.02$), platelet counts $> 450 \times 10^9/l$ ($P=0.03$), and cellular phase of myelofibrosis ($P=0.05$). At 5 years of follow-up, probability of thrombosis-free survival was 80.6% for patients with platelet counts $> 450 \times 10^9/l$ (versus 96.2% for patients with platelets $\leq 450 \times 10^9/l$, Figure 2a), 82.6% for patients with at least one cardiovascular risk factor (versus 96.9% for patients with no risk factor, Figure 2b), and 85.1% for patients with the cellular phase of myelofibrosis (versus 94.2% for those with other histological phases, Figure 2c). At multivariate analysis, only cellular phase (hazard ratio 4.8, 95% CI: 1.5–15.7, $P=0.009$) and presence of any cardiovascular risk factor (hazard ratio 6.9, 95% CI: 1.5–31.6, $P=0.01$) retained their prognostic value for the appearance of thrombosis.

Discussion

IM is a heterogeneous disease in terms of presentation and evolution. Thus, patients may present with high, normal, or low platelet counts, and the same applies to leukocyte counts, and they may remain asymptomatic for prolonged periods of time or to have constitutional symptoms or symptoms derived from the anemia and the splenomegaly. In turn, the spectrum of the causes of morbidity and mortality in IM is very wide, including bleeding, infection, acute transformation, portal hypertension, hepatic failure secondary to the liver myeloid metaplasia, hemosiderosis, and thrombosis.²¹ This is in sharp contrast with the other two Ph-negative MPDs, PV and ET, which behave rather homogeneously at presentation and have thrombosis, by far, as the main cause of morbidity.

**Figure 2** (a) Probability of thrombosis-free survival according to the platelet counts in 155 patients with IM. (b) Probability of thrombosis-free survival according to the presence or not of cardiovascular risk factors in 155 patients with IM. (c) Probability of thrombosis-free survival according to bone marrow histological phase in 155 patients with IM.

Nearly a half of PV patients and up to a third of patients with ET have thrombotic complications.^{1–5} With regard to IM, information on the occurrence of thrombosis is scarce, with a few published studies, including a small number of patients.^{6,7} Besides, data on the incidence of thrombosis in IM patients submitted to splenectomy have been provided.^{8–11} Brodmann *et al.*⁶ reported a rate of thromboembolic complications of 16.7% events per 100 patient years in a series of 26 patients with myelofibrosis. In another smaller study,⁷ a higher prevalence of coronary artery disease was found in IM patients as compared with those with PV and ET. In the splenectomy series of 223 IM patients from the Mayo Clinic,⁸ an increased rate of thrombosis was registered, with this complication being usually associated with the appearance of thrombocytosis following the procedure.⁸ In another series of 26 IM splenectomized patients,⁹ a 12% rate of venous thrombosis was observed. Finally, myelofibrosis was identified as a risk factor for the development of PVT after splenectomy in two studies.^{10,11}

Some characteristics of the present study deserve comment. First, only IM patients diagnosed and followed up at the same institution during their whole course were considered. Secondly, to avoid possible biases, patients with post-polycythemic and post-thrombocytemic myelofibrosis were excluded from the study, since they can retain their propensity to thrombosis. Finally, patients with the so-called 'pre-fibrotic' form of myelofibrosis were also excluded, as they typically present with marked thrombocytosis. Therefore, the study group included a pure population of patients with 'classical' IM. In this homogeneous group of patients, the overall frequency of thrombosis was 11.6%, including the thromboses that occurred at disease presentation or shortly before. When compared with data from the general population, a significant increase in venous thrombosis was noted. The factors associated with the occurrence of thrombosis were thrombocytosis, cellular phase of myelofibrosis, presence of cardiovascular risk factors, and Hb >11 g/dl.

When only thrombotic events developing after IM diagnosis were considered, thrombosis probability was 9.6% at 5 years. As expected, this is lower than the figures for PV and ET.^{1–5} At multivariate analysis, cellular phase of IM and presence of cardiovascular risk factors (arterial hypertension, smoking, hypercholesterolemia, and diabetes) were the independent predictors of thrombosis. In this sense, it must be pointed out that, although thrombocytosis did not retain its predictive value at multivariate level, most patients with thrombosis in whom such complication occurred before diagnosis or at presentation had high platelet counts and that, in our institution, the general policy was to administer platelet-lowering agents to patients with thrombocytosis. The importance of an adequate control of the cardiovascular risk factors to prevent the appearance of thrombosis does not need to be stressed. In this regard, the presence of high cholesterol levels in a minority of patients is of note, since low cholesterol levels are considered a marker of myeloproliferation. It could be therefore hypothesized that the presence of high cholesterol levels in a patient with IM could indicate even higher levels prior to diagnosis, with the myeloproliferation being not sufficient to normalize the cholesterol levels. According to this, high cholesterol levels would also be a cardiovascular risk factor in IM. As far as the cellular phase of IM is concerned, it is often associated with hyperproliferative features and there is current evidence of the role of blood cells in the pathogenesis of the thrombosis in the MPDs.^{22,23} In this regard, the recent identification of an acquired mutation in the *JAK2* gene in most patients with PV and a half of those with ET or IM^{24–27} is of great importance, not

only because it provides a rational basis for the use of targeted therapy, but also to investigate the possible relationship between the expression of the mutated gene and the risk of thrombosis in these patients.

In conclusion, the results herein reported provide for the first time reliable data on the frequency of major thrombosis in IM. As compared with the general population, a significant increase in venous thrombosis was found, with the main risk factors for the development of thrombosis being the hyperproliferative form of the disease and presence of cardiovascular risk factors. These observations should be taken into account to prevent thrombosis in patients with IM.

Acknowledgements

We are indebted to Dr Juan G Abraldes and Dr Joan-Carles Reverter for their help in the statistical analysis.

References

- 1 Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995; **123**: 656–664.
- 2 Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, Barbui T. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; **35**: 114–124.
- 3 Cortelazzo F, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F *et al.* Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and high risk of thrombosis. *New Engl J Med* 1995; **332**: 1132–1136.
- 4 Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-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**: 150–154.
- 5 Harrison CN, Campbell PJ, 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.
- 6 Brodmann S, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A, Skoda RC. Myeloproliferative disorders: complications, survival and causes of death. *Ann Hematol* 2000; **79**: 312–318.
- 7 Ganti AK, Potti A, Koka VK, Pervez H, Mehdi SA. Myeloproliferative syndromes and the associated risk of coronary artery disease. *Thrombos Res* 2003; **110**: 83–86.
- 8 Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood* 2000; **95**: 2226–2233.
- 9 Akpek G, McAneny D, Weintraub L. Risks and benefits of splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a retrospective analysis of 26 cases. *J Surg Oncol* 2001; **77**: 42–48.
- 10 Loring LA, Panicek DM, Karpeh MS. Portal system thrombosis after splenectomy for neoplasm or chronic hematologic disorder: is routine surveillance imaging necessary? *J Comput Assist Tomogr* 1998; **22**: 856–860.
- 11 Fujita F, Lyass S, Otsuka K, Giordano L, Rosenbaum DL, Khalili TM *et al.* Portal vein thrombosis following splenectomy: identification of risk factors. *Am Surg* 2003; **69**: 951–956.
- 12 Najean Y, Dresch C, Rain JD. The very long-term course of polycythemia: a complement to the previously published data of the Polycythemia Vera Study Group. *Br J Haematol* 1994; **86**: 233–235.
- 13 Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Talaric C, Gómez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol* 2002; **118**: 786–790.
- 14 Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) – a clinicopathological study. *Leukemia* 1999; **13**: 1741–1748.

- 15 Barosi G, Ambrosetti A, Finelli G, Grossi A, Leoni P, Liberato NL *et al*. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol* 1999; **104**: 730–737.
- 16 Lennert K, Naghai K, Schwarze EW. Patho-anatomical features of the bone marrow. *Clin Haematol* 1975; **43**: 331–351.
- 17 Fowkes FGR, Housley E, Cawood EHH, Macintyre CCA, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh artery study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* 1991; **20**: 384–392.
- 18 Stewart JA, Dundas R, Howard RS, Rudd AG, Wolfe CDA. Ethnic differences in incidence of stroke: prospective study with stroke register. *Br Med J* 1999; **318**: 967–971.
- 19 Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, ÓFallon M *et al*. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 452–463.
- 20 Lampe FC, Morris RW, Walker M, Shaper GA, Whincup PH. Trends in rates of different forms of diagnosed coronary heart disease, 1978 to 2000: prospective, population based study of British men. *Br Med J* 2005; **330**: 1046–1049.
- 21 Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C *et al*. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997; **97**: 635–640.
- 22 Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manorini S, Oldani M, Giovanelli S *et al*. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; **96**: 4261–4266.
- 23 Alvarez-Larrán A, García-Pagan JC, Abrales 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**: 329–335.
- 24 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**: 1054–1061.
- 25 Kralowics 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**: 1779–1790.
- 26 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005; **434**: 1144–1148.
- 27 Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Eber BL, Wernig G, Huntly BJ *et al*. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; **7**: 387–397.

3.3. TRABAJO 3

Aumento de la activación plaquetaria, leucocitaria y de la coagulación en la mielofibrosis primaria.

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. *Annals of Hematology*. Epub ahead of print.

Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis

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

Received: 29 May 2007 / Accepted: 7 September 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Platelet and leukocyte activation has been demonstrated in polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET), but such information is limited in primary myelofibrosis (PMF). Platelet, leukocyte, endothelial, and coagulation activation status was assessed in 26 PMF patients and compared with data from 22 age- and sex-matched healthy individuals. Study included flow cytometry assessment of platelet P-selectin expression [at baseline and after adenosine diphosphate (ADP), thrombin and arachidonic acid stimulation], platelet–neutrophil and platelet–monocyte complexes, and CD11b expression in neutrophils and monocytes. Additionally, soluble P-selectin, sCD40L, tissue factor, thrombomodulin, prothrombin fragment 1+2 (F1+2), and D-dimer were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The above parameters were correlated with the patients' clinical data and presence of the JAK2 V617F mutation. Compared with controls, PMF patients had increased baseline platelet activation, as shown by significantly higher levels of soluble and platelet P-selectin expression, and also higher percentages of platelet–

monocyte complexes. Neutrophil and monocyte CD11b expression was significantly higher in patients with the JAK2 mutation than in those with wild-type allele or the controls. Endothelial and coagulation activation, as demonstrated by increased plasma levels of thrombomodulin and F1+2, was also found in PMF, with patients with the JAK2 mutation showing significantly higher values of F1+2 than those with wild-type allele. In conclusion, PMF patients have platelet, leukocyte, endothelial, and coagulation activation similar to that in PV and ET. CD11b overexpression and F1+2 are correlated with the presence of the JAK2 mutation.

Keywords Primary myelofibrosis · Platelet activation · Leukocyte activation · Coagulation activation · JAK2 mutation

Introduction

Thrombosis represents the main complication in polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) [6, 11, 16]. With regard to primary myelofibrosis (PMF), the frequency of thrombosis is substantially lower, with the events being usually associated with hyperproliferative features of the disease and the coexistence of cardiovascular risk factors [9]. Based on the presence of an activated neutrophil phenotype and increased circulating platelet–neutrophil complexes (PNC), a role for leukocyte activation and platelet–leukocyte interaction in the thrombosis of the chronic myeloproliferative disorders (MPDs) has been suggested [1, 13, 14, 19]. In this sense, significantly increased platelet P-selectin, monocyte CD11b, and lipopolysaccharide-induced monocyte tissue factor expression has been recently found in patients with ET and thrombosis

A. Alvarez-Larrán · E. Arellano-Rodrigo · A. Domingo · F. Cervantes (✉)
Hematology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS,
University of Barcelona,
Barcelona, Spain
e-mail: fcervan@clinic.ub.es

J. C. Reverter
Hemotherapy and Hemostasis Department, Hospital Clínic,
IDIBAPS, University of Barcelona,
Barcelona, Spain

N. Villamor · D. Colomer
Hematopathology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS,
University of Barcelona,
Barcelona, Spain

[3]. With regard to PMF, leukocyte and platelet activation status is not well known.

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 PV and half of those with ET or PMF [5, 17, 21, 24]. In one study, patients with PMF and the mutation had a higher rate of thrombosis [28]. Of note, we have recently reported significantly higher platelet P-selectin expression in ET patients with the JAK2 mutation than in those with wild-type allele [3], suggesting a role for the mutation in the platelet activation of ET.

The aim of the present study was to assess the status of platelet, leukocyte, and coagulation activation in 26 patients with PMF. Additionally, the JAK2 V617F mutational status was correlated with the parameters of platelet and leukocyte activation.

Materials and methods

Patients and diagnostic criteria

Twenty-six patients diagnosed with PMF according to the criteria of the Italian Consensus Conference on Diagnostic for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia Group [4] were studied. Twenty-two age- and sex-matched healthy individuals served as controls. The study was approved by the local Ethics Committee, and informed consent was obtained from every patient and control. Bone marrow histologic subtypes were classified according to the criteria of Lennert et al. [22]: myelofibrosis with increased hemopoietic cellularity and reticulin fibrosis (MF/C), myelofibrosis with reticulin and collagen fibrosis but no new bone formation (MF/O-), and decreased hemopoietic cellularity, marked reticulin and collagen fibrosis, and osteosclerosis (MF/O+). Patients with post-PV or post-ET myelofibrosis were not included in the study.

Patients with underlying prothrombotic disorders were excluded. For such purpose, 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 20210 mutation, lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibodies as described elsewhere [1].

Table 1 shows the main clinicohematological features of the patients at the time of study. Nine out of the 26 patients had a history of thrombosis, but in two, the thrombosis had preceded for 10 and 25 years the diagnosis of PMF, respectively, and it was considered as unrelated to the disease. In the remaining seven patients, the thrombosis was considered as secondary to PMF. A total of eight vascular events were registered in the latter seven patients,

Table 1 Main clinico-hematological features at the time of the study in 26 patients with primary myelofibrosis

Features	Values
Age, years ^a	67 (27–80)
Gender (M/F)	13/13
Time lapse diagnosis-study, months ^a	42 (1–204)
Histologic phase of myelofibrosis ^b	
MF/C	13
MF/O–	10
MF/O+	3
Hb, g/l ^a	108 (45–148)
WBC count $\times 10^9/l^a$	6.4 (1–28.6)
Platelet count $\times 10^9/l^a$	185 (18–669)

^a Median (range); M/F male/female

^b According to Lennert et al. [22]

including peripheral artery disease (four cases), pulmonary thromboembolism (two cases), portal thrombosis (one case), and transient ischemic attack (one case). In most patients, the interval between the thrombosis and blood sampling was prolonged (median, 86 months; range, 2–238), and no patient was studied during the acute phase of the thrombosis.

At the time of study, 20 patients were receiving different therapies, including hydroxyurea, $n=12$; erythropoietin, $n=10$; aspirin, $n=3$; acenocumarol, $n=3$; anagrelide, $n=2$; and danazol, $n=1$. As expected, controls had higher Hb values than patients (mean, 133 ± 11 vs 110 ± 22 g/l, $p < 0.001$). No significant differences were found between patients and controls with regard to leukocyte and platelet counts.

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 were discarded, 4.5 ml of blood was collected into a citrate-containing tube. All flow cytometry studies were started within 10 min after sample collection. Phosphate-buffered saline (PBS) was used as universal diluent (pH 7.4, Roche, USA). PE-conjugated mouse anti-CD42b directed against the platelet glycoprotein Ib was used for platelet and leukocyte-platelet complexes identification and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD62 monoclonal antibody for 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. Anti-CD42b, anti-CD62, anti-CD11b, and anti-CD14 were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Irrelevant subclass-matched monoclonal antibodies served as negative controls. The DNA stain, DRAQ-5 (BioStatus,

Shephed, UK), was used to distinguish intact nucleated cells from non-nucleated, damaged nucleated cells, and cell aggregates. The human thrombin, the tetrapeptide glycyl-L-prolyl-L-arginyl-L-proline and the lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli*, strain 026: B6) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). ADP was purchased from Arkray (Aggrepack, 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 [27] and following the recommendations of the European Working Group on Cell Analysis [26]. To minimize artificial platelet activation, no washing, centrifugation, or fixation steps were performed as previously described [3].

Flow cytometry data were collected on a FACScan (BDIS, San Jose, CA, USA). Samples were analyzed as described [3]. Platelet P-selectin expression was quantified by converting mean fluorescent intensity (MFI) values into molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) units using standardized fluorescent beads (Quantum™ FITC and Quantum™ PE Medium Level, BangsLabs, USA).

Determination of platelet-leukocyte complexes

PNC and platelet–monocyte (PMC) complexes were measured by flow cytometry using a no-lyse, no-wash adapted method as described [1, 3]. Neutrophils were selected in a forward vs side scatter dot plot, and monocytes were selected in a FL-1 vs 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 vs side scatter dot plot. Results were expressed as a percentage of the neutrophils or the monocytes, respectively. A negative control was made in each patient using irrelevant subclass-matched monoclonal antibodies and anti-CD14.

Determination of CD11b in neutrophils and monocytes by flow cytometry

Neutrophil and monocyte membrane CD11b expression was measured as previously described [1]. Flow cytometric acquisition and analysis of at least 2,500 monocytes was performed. A side scatter vs FL-3 dot plot was used to distinguish nucleated cells from erythrocytes and debris, and in this first dot plot, a region was created to exclude leukocyte aggregates from the analysis. Neutrophils were selected in a forward vs side scatter dot plot. CD11b histograms were then obtained from a second gate,

selecting CD11b positive events in a FL-2 vs side scatter dot plot. Monocytes were selected in a FL-1 vs side scatter dot plot by gating CD14 positive cells. For CD11b measurement, FL-2 histograms were obtained from gated monocytes. As platelet P-selectin, the expression of neutrophil and monocyte CD11b was also quantified in MESF units.

Soluble markers of platelet activation

As soluble markers of platelet activation, the 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, due to the tight correlation between platelet count and either plasma sP-selectin or sCD40L [15, 29], levels of sP-selectin and sCD40L per platelet were calculated by dividing the concentration of these soluble markers by the individual platelet count.

Tissue factor and soluble markers of endothelial activation

Plasma tissue factor (sTF) levels were determined using a commercially available kit according to the manufacturer's protocol (American Diagnostica, Stanford, USA) and the results expressed in pg/ml. The plasma levels of soluble thrombomodulin (sTM) were determined as a marker of endothelial activation or damage by enzyme-linked immunosorbent assays (American Diagnostica) and the results expressed in ng/ml.

Soluble markers of coagulation and fibrinolysis activation

The plasma levels of prothrombin fragment 1+2 (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 µg/l for the D-dimer.

Allele-specific polymerase chain reaction for the JAK2 V617F mutation

Genomic DNA was extracted from blood samples using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany). Polymerase chain reaction (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 *Bsa*XI 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 *Bsa*XI restriction site.

Statistical methods

The SPSS 11.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA) was employed. Platelet–leukocyte complexes, platelet P-selectin, neutrophil, and monocyte CD11b expression, sP-selectin, sCD40L, sTF, sTM, F1+2, and D-dimer were expressed as mean and standard deviation. The chi-square test was used to compare categorical variables between the groups and the Mann–Whitney *U* test or the Student's *t* test for continuous variables. Differences between groups were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by post-hoc analysis with the Student–Newman–Keuls test. Statistical significance was considered at *p* values <0.05.

Results

JAK2 V617F mutational status

The JAK2 mutation was detected in 12 out of the 26 patients (46%). Patients with the mutation showed higher leukocyte counts than those without (12.3±8.3 vs 5.9±2.3, *p*=0.02). Age, sex, disease duration, Hb level, and platelet counts were not different depending on the presence or not of the mutation. Moreover, no difference was found with regard to the history of thrombosis between patients with and without the mutation. Actually, only 2 of the 12 patients with the JAK2 mutation had a history of thrombosis. However, the small size of the sample precludes any definitive conclusion in this sense.

Baseline and agonist-induced platelet P-selectin expression

As shown in Table 2, baseline platelet P-selectin expression was higher in patients than in controls. This difference was observed in the percentage of platelets expressing P-selectin (Table 2) but not in the intensity of such expression measured in MESF units (data not shown). No difference in P-selectin expression was observed between patients and controls after stimulation with ADP, thrombin, or AA (Table 2). No differences were observed in the percentage of platelets expressing P-selectin, either at baseline or after agonist activation according to the JAK2 mutational status.

There was no difference in the percentage of platelets expressing P-selectin according to the degree of bone marrow fibrosis at diagnosis. However, patients in the cellular phase of myelofibrosis had a significantly lower platelet P-selectin expression when measured in MESF units (data not shown).

Table 2 Percentages of platelets expressing P-selectin at baseline and after agonist-induced activation in healthy controls and PMF patients

	Controls (<i>n</i> =22)	PMF patients J AK2 V617F (<i>n</i> =12)	PMF patients JAK2 wild type (<i>n</i> =14)	<i>p</i> value ^a
Baseline	3.3±1.6	8.2±3.9*	7±2.6*	<0.001
ADP	54.1±12.7	49.2±12.8	47.5±17.1	NS
Thrombin	39.8±25.3	49.4±20.8	40.6±16.9	NS
AA	43.1±24.4	33.6±14.2	43.5±18.1	NS

Values given as mean and standard deviation

NS Not significant; ADP adenosine diphosphate; AA arachidonic acid

^aOne-way ANOVA test

**p*<0.05 vs healthy controls, paired comparisons using the post-hoc analysis with the Student–Newman–Keuls test

There was no difference in P-selectin expression according to the presence absence of thrombosis.

Platelet–leukocyte complexes and leukocyte CD11b expression

As can be seen in Table 3, PMF patients had significantly higher percentages of circulating PMC. As a whole, PMF patients had a significantly higher neutrophil and monocyte CD11b expression than the controls, with CD11b over-expression being observed both at baseline and after LPS activation (data not shown). However, when the CD11b expression was compared in controls and patients according to JAK2 status, patients with the mutation showed higher neutrophil and monocyte CD11b expression than those without the mutation or the controls, whereas the only statistically significant difference between wild-type PMF patients and the controls was the LPS-induced CD11b neutrophil expression (Table 3, Fig. 1).

In patients with the JAK2 mutation, a positive correlation was observed between leukocyte count and baseline monocyte CD11b expression (*R*=0.8; *p*=0.01) but not with baseline neutrophil CD11b expression. Such correlation was not observed after LPS activation or in the JAK2-negative patients, suggesting that baseline monocyte activation depends on JAK2 mutational status. A logistic regression analysis according to JAK2 mutational status failed to demonstrate that leukocyte count and CD11b expression were independent variables, but the small size of the sample precludes any definitive conclusion.

Tissue factor and soluble markers of platelet, endothelial, and coagulation activation

Soluble P-selectin levels were significantly higher in patients than in controls (Table 4), and the differences persisted when the values were adjusted by the platelet counts (data not

Table 3 Platelet–leukocyte complexes and neutrophil and monocyte CD11b expression in healthy controls and patients with PMF

	Controls (n=22)	PMF patients JAK2 V617F (n=12)	PMF patients JAK2 wild type (n=14)	p value*
PNC	16±15	26±15	27±24	NS
PMC	34±21	65±23 ^a	67±27 ^a	<0.001
Baseline CD11b				
Neutrophil	33±14	145±117 ^{a,b}	79±80	0.001
Monocyte	69±33	282±179 ^{a,b}	135±95	<0.001
LPS induced CD11b				
Neutrophil	203±41	469±159 ^{a,b}	300±108 ^a	<0.001
Monocyte	177±42	355±175 ^{a,b}	237±104	0.001

PNC (platelet-neutrophil complexes) and PMC (platelet-monocyte complexes) are given as percentages and CD11b in MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) units×10³ and values given as mean and standard deviation.

LPS lipopolysaccharide

^aOne-way ANOVA test

**p*<0.05 vs healthy controls

**p*<0.05 vs PMF patients without the JAK2 mutation (in both cases paired comparisons were made using the post-hoc analysis with the Student–Newman–Keuls test)

shown). Soluble CD40L was higher in patients than in controls, but the difference was not statistically significant (Table 4). As can be seen in Table 4, patients showed significantly higher levels of thrombomodulin, a known marker of endothelial activation. Besides, plasmatic tissue factor levels and D-dimer

Table 4 Plasma levels of platelet, endothelial and coagulation activation markers in healthy controls and patients with PMF

	Controls (n=22)	PMF patients JAK2 V617F (n=12)	PMF patients JAK2 wild type (n=14)	p value ^a
sP-selectin, ng/mL	32±12	90±58 ^a	66±56 ^a	0.002
sCD40L, pg/mL	81±22	114±33	119±107	NS
Tissue factor, pg/mL	79±27	62±19	61±26	NS
sTM, ng/mL	25±10	40±13 ^a	40±19 ^a	0.001
D-dimer, µg/L	86±61	50±25	66±33	NS
F1+2, nmol/L	0.76±0.22	3.7±1.5 ^{a,b}	2.7±0.8 ^a	<0.001

Values given as mean±standard deviation

sP-selectin Indicates soluble P-selectin; *sCD40L* soluble CD40 ligand; *sTM* soluble thrombomodulin; *F1+2* prothrombin fragment 1+2; *NS* not significant

^aOne-way ANOVA test

**p*<0.05 vs healthy controls

**p*<0.05 vs PMF patients without the JAK2 mutation (in both cases paired comparisons were made using the post-hoc analysis with the Student–Newman–Keuls test)

were lower in patients than in controls, but it must be pointed out that the patients' values were actually into the normal range and the difference did not reach statistical significance.

Increased F1+2 levels were found in all the 23 assessable patients (i.e., excluding the three who were receiving acenocumarol). When compared with controls, patients showed

Fig. 1 Neutrophil (a and b) and monocyte (c and d) CD11b expression in patients with and without the JAK2 V617F mutation and controls at baseline and after incubation with lipopolysaccharide (LPS). MESF Molecules of equivalent soluble fluorochrome. Data are expressed as mean values and standard mean error; *p* value corresponds to one-way ANOVA. Post-hoc analysis using the Student–Newman–Keuls test paired comparisons: *Significant difference between IMF patients with JAK2 mutation with respect to patients without the mutation and the controls; **Significant difference among the three groups

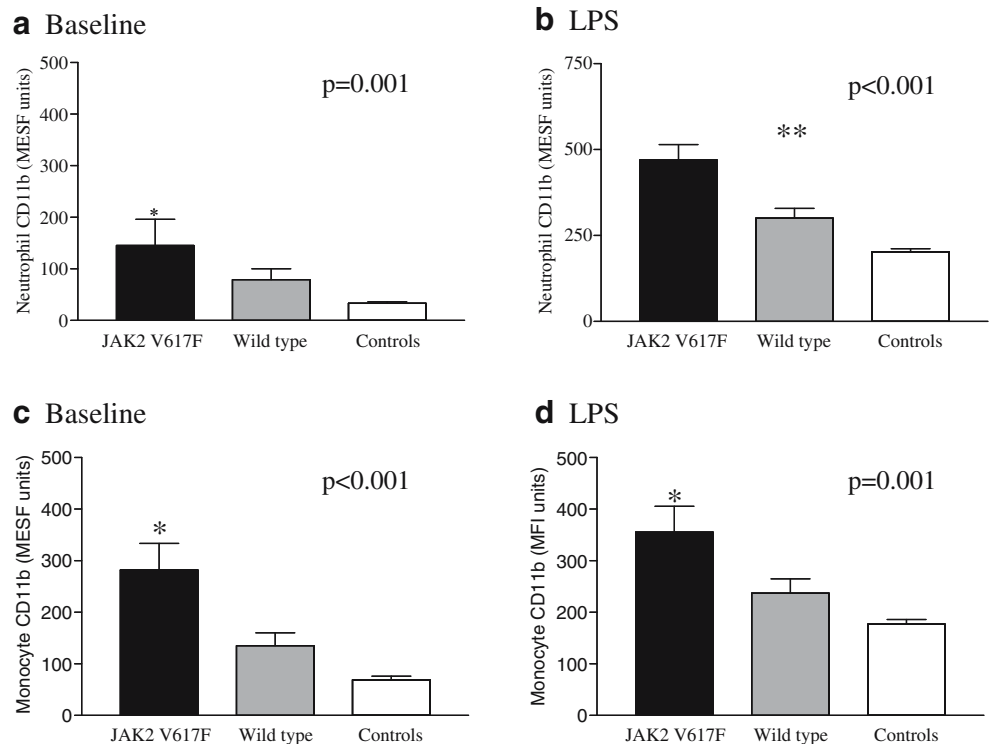


Table 5 Clinicohematological data, the type of thrombosis, the results of platelet, leukocyte and plasma activation, and the JAK2 mutational status in seven patients who had thrombosis

Age/sex	Case 1	Case 2 ^a	Case3	Case 4	Case 5	Case 6 ^a	Case 7
	69/M	46/M	80/F	79/M	64/F	71/F	64/F
Type of thrombosis	PAD	PE, PT	PAD	PAD	PAD	PE	TIA
WBC count $\times 10^9/l$	6.7	4.5	9	6	3.6	18.9	6.1
Hb (g/l)	101	122	124	113	88	99	106
Platelet count $\times 10^9/l$	259	181	314	294	49	66	246
JAK2V617F mutation	+	–	–	–	–	+	–
Platelet P-selectin (%)	4	7	8	9	9	15	4
PNC (%)	43	38	26	31	21	4	19
PMC (%)	80	92	77	89	84	23	67
Neutrophil CD11b	80	24	24	45	174	116	93
Monocyte CD11b	215	108	53	110	371	238	213
sP-selectin (ng/ml)	115	41	54	33	113	64	74
sCD40L (pg/ml)	131	74	93	114	73	161	96
Tissue factor (pg/ml)	84	73	65	48	41	65	39
sTM (ng/ml)	52	15	37	43	42	53	20
D-dimer ($\mu\text{g/l}$)	23	37	56	109	78	54	63
F1+2 (nmol/l)	5.05	0.15	2.62	1.87	3.4	2.75	3.7

M Male, F female, PAD peripheral artery disease, PE pulmonary embolism, PT portal thrombosis, TIA transient ischemic attack, PNC platelet–neutrophil complexes, PMC platelet–monocyte complexes; sP-selectin soluble P-selectin; sCD40L soluble CD40 ligand; sTM soluble thrombomodulin; F1+2 prothrombin fragment 1+2

^aAcenocumarol treatment

significantly higher levels of F1+2 (Table 4). A positive correlation was observed between F1+2 and both neutrophil CD11b ($R=0.688$, $p=0.001$) and monocyte CD11b expression ($R=0.628$, $p=0.005$). Patients with the JAK2 mutation showed significantly higher levels of F1+2 than those with the wild-type allele (Table 4). No differences in the other soluble markers of platelet and leukocyte activation were observed according to JAK2 mutational status.

Table 5 summarizes the main clinicohematological data, the type of thrombosis, the results of platelet, leukocyte and plasma activation, and the JAK2 mutational status in the seven patients who had thrombosis.

Discussion

The spectrum of causes of morbidity and mortality in PMF includes, among others, acute transformation, bleeding, infection, hemosiderosis, portal hypertension, liver failure, and thrombosis [8]. Whereas thrombosis represents the main complication of PV and ET, occurring in 45 and 30% of patients, respectively [6, 11, 16], the frequency of thrombosis in PMF accounts for 11.6% of patients [9]. Platelet and leukocyte activation has been demonstrated in PV and ET [1, 3, 13, 14, 18], and its possible role in the thrombosis of these patients has been suggested [1, 3, 13, 14, 19]. With regard to PMF, information on the status of leukocyte and platelet activation is limited [18, 19, 30].

In myelofibrosis, abnormalities of the platelet membrane have been reported, resulting in continuous platelet activation and α -granule depletion [23]. An increased baseline platelet P-selectin expression was observed in our patients, confirming previous observations by Jensen et al. [18] and Villmow et al. [30]. In contrast with ET [3], platelet P-selectin expression after agonist stimulation was normal, and no differences were observed according to JAK2 mutational status. We also observed increased levels of sP-selectin. In this sense, it must be noted that, in mouse, it has been reported that a procoagulant state can be induced by increased plasma levels of sP-selectin [2]. Nevertheless, the platelet activation observed in our PMF patients was less intense than that reported in ET [3].

Platelet–leukocyte complexes, especially PMC, have thrombogenic properties, due to their procoagulant surface and their capacity of tissue factor generation [12]. Patients with MPDs have an increased number of circulating platelet–leukocyte complexes, which has been correlated with a history of thrombosis, thrombocytosis, and platelet or leukocyte activation [14, 19]. In PV, the percentage of circulating PNC has been reported to be 40 to 50% [1, 14], whereas in ET, it increases to 50 to 60% for PNC and to 80% for PMC [3, 14]. The lower proportion of PNC and PMC observed in the present study could be partially ascribed to the overall lower platelet counts in PMF. An increased number of circulating PNC and PMC was previously found in PMF by

Jensen et al. [19], whereas no significant differences between patients and controls were observed by Villmow et al. [30]. The adhesion of the leukocytes to the platelets is mediated by the platelet P-selectin and the leukocyte P-selectin glycoprotein ligand. An alternative mechanism involves neutrophil CD11b and platelet GPIIb/IIIa or GPIb via fibrinogen. The P-selectin and leukocyte CD11b overexpression observed in the present study would indicate that both mechanisms of platelet adhesion to the leukocytes would operate in PMF.

Increased CD11b expression has been reported in ET and PV, being correlated with both coagulation activation [13] and thrombosis [1, 3]. To the best of our knowledge, leukocyte CD11b expression has not been analyzed in myelofibrosis. In our patients, increased CD11b expression was found at baseline and after LPS activation. Interestingly, this overexpression was restricted to patients carrying the JAK2 mutation, suggesting that the latter could be involved in CD11b overexpression. In this sense, neutrophil and monocyte CD11b expression was higher than the values reported by our group in ET [3], a finding that could reflect the higher percentage of mutated alleles observed in PMF. In addition, and in keeping with previous findings in ET and PV [13], a significant correlation was noted between baseline leukocyte CD11b expression and plasma levels of F1+2, a marker of clotting activation.

A possible implication of the enhanced CD11b expression would be the known pathogenic interaction between the leukocytes and megakaryocytes in PMF [25]. It could be hypothesized that the increased CD11b expression would enhance the adhesion of the neutrophils to the megakaryocytes, thus facilitating emperipolesis, a phenomenon implicated in development of myelofibrosis [25].

Increased levels of sTM was observed in PMF patients, suggesting a continuous endothelial cell damage. In this sense, platelet and leukocyte activation could result in the engagement of the soluble adhesion receptors and release of proteases, cytokines, or reactive oxygen species [3, 7, 10, 13]. The production of sTM by the megakaryocytes, platelets, and neutrophils or an enhanced bone marrow remodeling [20] could be an alternative explanation. In contrast, sTF was within the normal range in PMF patients. Finally, increased plasma levels of the prothrombin fragment F1+2, a marker of coagulation activation, were found in all assessable PMF patients with the values being higher in PMF patients with the JAK2 V617F mutation. This was in contrast with the finding of normal D-dimer levels, suggesting a state of continuous coagulation activation but without fibrin deposition.

In conclusion, PMF patients show features of platelet, leukocyte, endothelial, and coagulation activation similar to those found in PV and ET. CD11b overexpression and F1+2 are correlated with presence of the JAK2 mutation.

Acknowledgements We thank the personnel of the Laboratories of Hemostasis and Hemopathology of the Hospital Clínic for their excellent technical assistance.

References

1. Alvarez-Larrán A, Garcia-Pagan JC, Abrales JG, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, Cervantes F (2004) Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythemia vera. *Br J Haematol* 124:329–335
2. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD (2000) Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13835–13840
3. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F (2006) Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 91:169–175
4. Barosi G, Ambrosetti A, Finelli G, Grossi A, Leoni P, Liberato NL, Petti MC, Pogliani E, Ricetti M, Rupoli S, Visani G, Tura S (1999) The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol* 104:730–737
5. 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 A (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061
6. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Sole F, Hernandez-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E (1999) Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 13:50–154
7. Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W (2002) Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 107:340–349
8. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C, Montserrat E (1997) Identification of ‘short-lived’ and ‘long-lived’ patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 97:635–640
9. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E (2006) Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia* 20:55–60
10. Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M (1992) Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood* 80:1254–1263
11. Elliott MA, Tefferi A (2005) Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 128:275–290
12. Engstad CS, Lia K, Rekdal O, Olsen JO, Osterud B (1995) A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J Leuk Biol* 58:575–581
13. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T (2000) Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 96:4261–4266
14. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T (2005) Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 33:523–530

15. Fijnheer R, Frijns CJM, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK (1997) The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 77:181–185
16. Gruppo Italiano Studio Policitemia (1995) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 123:656–664
17. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 434:1144–1148
18. Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC (2000) Increased platelet activation and abnormal glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 110:116–124
19. Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC (2001) Increased circulating platelet-leukocytes aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol* 66:143–151
20. Jensen MK, Riisbro R, de Nully Brown P, Brunner N, Hasselbach HC (2002) Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma from patients with idiopathic myelofibrosis or polycythemia vera. *Eur J Haematol* 69:43–49
21. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New Engl J Med* 352:1779–1790
22. Lennert K, Naghai K, Schwarze EW (1975) Patho-anatomical features of the bone marrow. *Clin Haematol* 43:331–351
23. Leoni P, Rupoli S, Lai G, Brunelli MA, Belmonte MM, Pugnali A, Rabini RA, Mazzanti L, Biagini G (1994) Platelet abnormalities in idiopathic myelofibrosis: functional, biochemical and immunomorphological correlations. *Haematologica* 79:29–39
24. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Eberth 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 (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387–397
25. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM (2000) Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 96:1342–1347
26. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV (1998) European Working Group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 79:885–896
27. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA (1987) Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70:307–315
28. Tefferi A, Lasho TL, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gilliland DG (2005) The JAK2^{V617F} tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 131:320–328
29. Viillard JF, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Déchanet J, Grosset C, Moreau JF, Praloran V, Nurden P, Pellegrin JL, Nurden AT, Ripoché J (2002) Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 99:2612–2614
30. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC (2003) Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res* 108:139–145

3.3.1. RESUMEN

En la PV y la TE se ha demostrado la existencia de un aumento en los marcadores de activación leucocitaria y plaquetaria, correlacionándose el grado de activación de algunos de estos marcadores con la presencia de la mutación V617F de JAK2 y el antecedente de trombosis. El hecho de que las tres enfermedades compartan una etiopatogenia común, a partir de la adquisición de la mutación de JAK2, y que recientemente hayamos descrito que en la MFP existe también un aumento de complicaciones trombóticas sugieren que en esta enfermedad podría existir asimismo una sobreexpresión de dichos marcadores de activación. Con la finalidad de determinar si en la MFP existe un aumento en la activación leucocitaria, plaquetaria, endotelial y de la coagulación, se estudió una cohorte constituida por 26 pacientes afectados de MFP y un grupo control formado por 22 sujetos sanos. Los parámetros evaluados incluyeron la determinación de la P-selectina (basal y tras estímulo con agonistas plaquetarios), la expresión del antígeno CD11b granulocitario, los complejos leucocito-plaqueta circulantes y la concentración plasmática de P-selectina, CD40L, factor tisular, trombosmodulina, fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) y dímero-D.

Los pacientes con MFP mostraron una expresión de P-selectina basal más elevada y un porcentaje mayor de complejos monocito-plaqueta que los controles sanos, siendo las diferencias estadísticamente significativas. La expresión de CD11b en neutrófilos y monocitos fue significativamente más alta en los pacientes con MFP JAK2 positiva que en los pacientes con MFP JAK2 negativa o en los controles. Además, la concentración plasmática de trombosmodulina y de F1+2 fue significativamente más alta en la MFP que en

los individuos sanos, mostrando, a su vez, los pacientes con la mutación un valor de F1+2 significativamente mayor que los pacientes sin la mutación. De los anteriores resultados se puede concluir que los pacientes con MFP presentan parámetros de activación leucocitaria, plaquetaria, endotelial y de la coagulación similares a los observados en la PV y la TE y que algunos de estos parámetros se correlacionan con la presencia de la mutación V617F del gen JAK2.

4. DISCUSIÓN

4.1. Sobreexpresión del antígeno CD11b granulocitario en el síndrome de Budd-Chiari y la trombosis portal secundarios a policitemia vera.

Las complicaciones trombóticas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la PV(42). Entre ellas, el SBC y la TP constituyen dos tipos de trombosis especialmente graves. La PV es la causa más frecuente de este tipo de trombosis, lo que sugiere que los pacientes con esta enfermedad tienen una predisposición a desarrollar trombosis en las citadas localizaciones (105,206,207). Esta preferencia topográfica puede ser el resultado de los mecanismos, claramente diferenciales, que intervienen en la patogenia de la trombosis de la PV, como la hiperviscosidad sanguínea debida al aumento del hematócrito, la trombocitosis y las alteraciones en el funcionalismo plaquetario (43,55,58). A estos factores cabe añadir la reciente descripción de un incremento en la activación leucocitaria basal y la coexistencia en algunos casos de alteraciones de la coagulación asociadas a un estado de trombofilia (44,66,208,209). Falanga et al describieron un aumento de la expresión de CD11b granulocitario y del contenido de elastasa en los pacientes con PV y TE (44). El CD11b es una proteína de adhesión de la membrana, presente en neutrófilos y monocitos, que pertenece a la familia de las integrinas $\beta 2$. Este antígeno interviene en la adhesión firme de los granulocitos al endotelio que se produce tras la marginación o *rolling*, siendo por tanto una proteína fundamental en la migración de los granulocitos a los lugares de inflamación. La unión entre el granulocito y la célula endotelial se establece a través del CD11b y el ICAM-1 (210,211). Además, el CD11b interviene en la adhesión a

las proteínas de la matriz extracelular (212) y en la formación de los complejos leucocito-plaqueta, estos últimos gracias a la unión con la glucoproteína plaquetaria Ib (213). Tras la activación leucocitaria, los granulocitos aumentan la concentración de moléculas de CD11b en su membrana, facilitando por tanto sus propiedades adhesivas y de fagocitosis (214). Por ello, se considera al CD11b como marcador del estado de activación de los granulocitos.

En el presente estudio se seleccionó una cohorte de pacientes con SBC y TP, por ser este tipo de trombosis característica de los pacientes con PV. Es posible, por ello, que de existir alguna alteración protrombótica, característica de la PV, ésta sería más manifiesta en este tipo de trombosis que en otras complicaciones trombóticas como la cardiopatía isquémica, la vasculopatía periférica o el ictus, en las cuales el papel de la edad o de los factores de riesgo cardiovascular están bien establecidos. Además, el hecho de que el servicio de Hepatología del Hospital Clínic sea centro de referencia para este tipo de patología nos brindaba la oportunidad de disponer de una cohorte de pacientes suficientemente amplia.

Confirmando resultados de estudios previos (44,66,209), se observó que los pacientes con PV tenían una expresión basal incrementada de CD11b granulocitario, hallazgo que indica la existencia de una activación granulocitaria basal. Sin embargo, lo más importante fue que la intensidad de dicha activación resultó significativamente mayor en la cohorte de pacientes con PV y trombosis que en la de los pacientes con PV sin trombosis. Por otra parte, los otros dos grupos control (pacientes con trombosis sin PV y donantes de sangre) presentaron una expresión basal de CD11b similar. Estos resultados indicarían que la sobreexpresión de CD11b podría desempeñar un papel en la patogenia

del SBC y de la TP en los pacientes con PV. Es importante destacar que algunos de los pacientes del grupo analizado desarrollaron la trombosis cuando la enfermedad estaba bien controlada, es decir, con cifras de hematócrito y plaquetas normales, dato que apoya la hipótesis de que las alteraciones en el funcionalismo de los granulocitos pueden tener un papel en la trombogénesis. Este hallazgo tiene dos consecuencias prácticas. En primer lugar, teniendo en cuenta que cuando se publicó este trabajo todavía no se había descrito la mutación de JAK2 como marcador de PV, la sobreexpresión de CD11b podría ser de utilidad para establecer el diagnóstico de SMPC oculto en pacientes con SBC o TP. En este sentido, las curvas ROC realizadas mostraron una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de PV cuando se aplicaron a todos los pacientes con trombosis. Por otro lado, la sobreexpresión de CD11b podría ayudar a identificar un subgrupo de pacientes con un riesgo incrementado de trombosis. Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar un estudio prospectivo en el que la determinación basal de CD11b se correlacionase con la aparición de complicaciones trombóticas.

La medición del CD11b en unidades arbitrarias de fluorescencia (unidades MFI) tiene la limitación de que dichas unidades dependen de la calibración y de la vida útil del láser de cada citómetro de flujo, impidiendo, por tanto, la comparación de los resultados con los de otros laboratorios. Esta limitación dificulta la hipotética generalización de dicho parámetro como marcador diagnóstico o de riesgo trombótico. En el presente estudio, para facilitar la interpretación de estos resultados con los obtenidos en otros laboratorios, creamos un sencillo índice que resultó de dividir la expresión basal del CD11b granulocitario por la expresión basal de CD11b linfocitario. Una

alternativa para resolver este problema sería la utilización de unidades MESF en las que la expresión en unidades MFI se transformase en la concentración de moléculas de fluorocromo en la membrana a partir de una recta obtenida con bolitas calibradoras. También es importante reseñar que la expresión basal de los marcadores de activación granulocitaria como el CD11b puede modificarse debido a múltiples estímulos. En este sentido, y para evitar precisamente cualquier artefacto que pudiese interferir en la medición de la activación basal, se empleó una técnica de citometría de flujo que redujo la manipulación de la muestra al mínimo, de tal forma que en todo el proceso de cuantificación del CD11b no se realizó ninguna centrifugación ni se utilizaron las soluciones de lisis de hematíes o fijadores celulares empleados habitualmente en las técnicas de citometría de flujo convencionales (215).

Los resultados de este estudio, dada la naturaleza del mismo, no permiten recomendar que la expresión basal de CD11b o el índice granulocito/linfocito de CD11b se utilicen como marcadores de SMPC o de riesgo trombótico. No obstante, es importante destacar que dichos parámetros mostraron una alta sensibilidad y especificidad en este sentido, como demostró el hecho de que en el 100% de los pacientes con SBC/TP secundarios a PV la expresión de CD11b fue $> 49,6$ unidades MFI y el 88% de los pacientes presentaron una ratio de CD11b granulocito/linfocito $> 9,9$, mientras que sólo 2 y 1 de los 20 pacientes con SBC/TP no asociado a PV mostraron una expresión de CD11b o un índice de CD11b granulocito/linfocito por encima de los valores de punto de corte.

La determinación de la producción de radicales de oxígeno en los pacientes con SMPC ha arrojado resultados contradictorios en los diferentes

estudios publicados (67,68,209). Estas diferencias pueden ser debidas a los distintos métodos de análisis empleados o en los criterios de selección de pacientes. En el presente estudio hemos demostrado un incremento en la producción basal, sin estímulo, de radicales de oxígeno en los pacientes con PV respecto a los controles sanos o los pacientes con SBC/TP sin SMPC asociado. Sin embargo, no hemos podido demostrar diferencias entre los pacientes con y sin trombosis ni tampoco entre los diferentes grupos tras estímulo con FMLP, un péptido bacteriano considerado agonista de la activación leucocitaria. Estos datos podrían indicar que, en circunstancias basales, los granulocitos de los pacientes con PV tienen una capacidad incrementada de inducir daño tisular y, sobre todo, endotelial, el cual se vería facilitado por el aumento en la capacidad adhesiva de los granulocitos de la PV. Se podría especular que el factor que desequilibra la balanza hacia la aparición de trombosis en la PV pudiera ser el aumento en la adhesión de los granulocitos al endotelio a partir de la sobre-expresión de CD11b y que la génesis de radicales libres por estas células podría contribuir al daño endotelial, la exposición de factor tisular y la consiguiente activación de la cascada de la coagulación, lo que llevaría a la génesis de la trombosis.

Por otro lado, existe una evidencia cada vez mayor de que las plaquetas pueden iniciar los procesos inflamatorios y trombóticos, gracias a las relaciones que establecen con los granulocitos y la cascada de la coagulación. En el presente estudio los pacientes con PV presentaron un porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes mayor que el de los controles sanos o el de los pacientes con trombosis no asociada a SMPC. Sin embargo, no hubo diferencias entre los pacientes afectados de PV con y sin trombosis. Previamente,

Maugeri et al demostraron, en un estudio realizado en pacientes con PV y TE, que la expresión de P-selectina y los complejos leucocito-plaqueta circulantes se correlacionaban con la desgranulación de los neutrófilos, la presencia de fibrinógeno ligado de forma estable a la superficie leucocitaria, así como a un mayor contenido y expresión extracelular de factor tisular (77,80). Jensen et al refirieron 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 (81,82). Falanga et al, por su parte, registraron un elevado porcentaje de complejos leucocito-plaqueta en pacientes con TE y PV y que la presencia de dichos agregados mixtos se correlacionaba con parámetros de activación leucocitaria, como la expresión aumentada de CD11b de membrana (46). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que los agregados mixtos formados por leucocitos y plaquetas que circulan en un porcentaje incrementado en la sangre de los pacientes con PV desempeñarían un papel en la etiopatogenia de la trombosis de la PV, si bien la utilidad de este marcador como factor de riesgo de trombosis no ha podido establecerse hasta el momento.

En conclusión, la expresión de CD11b granulocitario está marcadamente incrementada en los pacientes con PV que presentan SBC o TP. Dicha alteración podría intervenir en la patogenia de la trombosis de la PV facilitando la adhesividad de los granulocitos al endotelio y a las plaquetas. Se requieren estudios prospectivos para determinar si la sobre-expresión de CD11b puede utilizarse como factor de riesgo trombótico en la PV.

4.2. Incidencia de trombosis y factores de riesgo para esta complicación en la mielofibrosis primaria: análisis de una serie de 155 pacientes de una sola institución.

La MFP es una enfermedad heterogénea, tanto en su presentación como en la aparición de diferentes complicaciones a lo largo del curso de la enfermedad. Así, mientras algunos pacientes permanecen asintomáticos durante un largo período de tiempo tras el diagnóstico, otros, en cambio, presentan, ya de entrada o poco después, sintomatología constitucional, anemia o síntomas derivados de la esplenomegalia (177,178,181). Lo mismo ocurre con la cifra de plaquetas o de leucocitos que varían de forma marcada de unos pacientes a otros, pudiendo estar bajas, normales o altas (176). Igual sucede con las causas de morbilidad y mortalidad, entre las que se incluyen el sangrado, las infecciones, la transformación blástica, la hipertensión portal, la insuficiencia hepática y la trombosis(216). Todo ello contrasta con los otros dos SMPC, la PV y la TE, en los que la presentación clínica es mucho más homogénea y la trombosis constituye la principal causa de mortalidad y morbilidad.

En torno a la mitad de los pacientes con PV y un tercio de los afectados de TE presentan complicaciones trombóticas (42,47,54,63,217). Con respecto a la MFP, la información existente acerca de la frecuencia de trombosis es escasa, reduciéndose a unos pocos estudios realizados en series con un número limitado de pacientes (201,202). Además, se ha referido la aparición de complicaciones trombóticas tras la esplenectomía (204,205,218,219).

Brodmann et al (201) registraron un total de 10 complicaciones trombóticas (6 venosas y 4 arteriales) en 26 pacientes con MFP, lo cual

suponía una incidencia de 13,8 trombosis/100 pacientes/año, dato similar al observado en los pacientes con PV y TE, cuya incidencia fue de 16,7 y 7,5 trombosis/100 pacientes/año, respectivamente. En esta serie las trombosis cerebrales y venosas profundas supusieron el 70% de las trombosis, dato que podría sugerir, a pesar del pequeño tamaño de la muestra, que la incidencia de este tipo de trombosis está aumentada en la MFP. Por otro lado, Ganti et al (202) estudiaron 181 pacientes con SMPC, 30 de ellos con MFP, en los cuales se evaluó el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica. Los pacientes con MFP presentaron un riesgo 8 veces mayor de padecer dicha complicación que un grupo control constituido por pacientes con leucemia mieloide crónica. Sin embargo, cuando en el análisis multivariado se corrigió el riesgo teniendo en cuenta la edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular, tal asociación desapareció, indicando, por tanto, que el exceso de trombosis que se había observado en la MFP era más bien debido a la mayor edad de este grupo de pacientes (202). En la serie de la Clínica Mayo, constituida por 223 pacientes sometidos a esplenectomía (205), se registró un incremento en la frecuencia de trombosis tras el procedimiento, asociándose la trombosis con la trombocitosis que con frecuencia aparece tras la intervención (205). En otra serie constituida por 26 enfermos con MFP a los que se realizó una esplenectomía se objetivó la aparición de una trombosis venosa en el 12% de los pacientes (218). Finalmente, dos estudios realizados en pacientes con trombosis del eje espleno-portal identificaron a la MFP como un factor de riesgo para presentar trombosis portal tras la esplenectomía (204,219). Todos estos estudios, apuntaban, por tanto, en la dirección de que en la MFP podría existir un incremento en la frecuencia de complicaciones trombóticas.

En cuanto al presente estudio, es importante realizar las siguientes consideraciones. En primer lugar, sólo se incluyeron aquellos pacientes que se diagnosticaron y se siguieron en la misma institución durante todo el curso evolutivo de la enfermedad. Por otra parte, se excluyeron los casos de mielofibrosis post-PV o post-TE, ya que estos pacientes podrían retener la propensión a la trombosis inherente a la PV y la TE. Finalmente, los pacientes con la llamada forma pre-fibrótica de la MFP se excluyeron asimismo del estudio, pues estos pacientes típicamente se manifiestan con una trombocitosis aislada. Por lo tanto, el grupo de estudio incluyó una serie constituida por 155 pacientes con la forma clásica de la MFP. En este grupo homogéneo, la frecuencia global de trombosis fue del 11,6%, incluyendo tanto las trombosis presentes al diagnóstico o en los meses previos al mismo como las que aparecieron a lo largo de la evolución. Al comparar la incidencia de trombosis con la registrada en la población general de la misma edad y sexo, los pacientes con MFP mostraron un riesgo aumentado de trombosis cerebral y trombosis venosa profunda. En el análisis multivariado, la trombocitosis, la fase celular de la mielofibrosis, la presencia de algún factor concomitante de riesgo cardiovascular y la cifra de Hb > 11 g/dL fueron las variables iniciales que se asociaron a un mayor riesgo de trombosis.

Cuando se estudiaron solamente las complicaciones trombóticas aparecidas tras el diagnóstico de MFP, la probabilidad actuarial de desarrollar trombosis a los 5 años fue del 9,6%, frecuencia, como era de esperar, inferior a la registrada en la PV y la TE (42,47,54,63,217). En el análisis multivariado, la fase celular y la presencia de factores de riesgo cardiovascular fueron las variables que se asociaron de forma independiente a un riesgo mayor de

trombosis a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad. Es importante destacar que, si bien la presencia de trombocitosis en el momento del diagnóstico no retuvo su significado pronóstico en el análisis multivariado, es práctica habitual en nuestra institución la instauración de tratamiento citorreductor en todos los pacientes con MFP y trombocitosis, tratamiento que ha demostrado ser eficaz en la disminución de complicaciones trombóticas en los pacientes con TE y PV de alto riesgo (41,54,63).

Otro aspecto importante a destacar es el control adecuado de los factores de riesgo cardiovascular para prevenir las complicaciones trombóticas. En este sentido, la mayor edad de los pacientes con MFP, respecto a los pacientes con PV o TE, podría otorgar un papel mayor a la aterosclerosis y los factores de riesgo cardiovascular en la MFP, a los cuales se añadirían los mecanismos patogénicos protrombóticos dependientes de la propia mieloproliferación. Así, cabe destacar la presencia de valores de colesterol elevados en una pequeña proporción de pacientes, pues es típico de la MFP encontrar niveles bajos de colesterol, como hallazgo característico de la mieloproliferación. Podría, pues, especularse con que la presencia de hipercolesterolemia en la MFP indicaría la posible existencia de niveles más altos antes de la aparición de la enfermedad y que, por tanto, en esos pacientes la mieloproliferación no sería suficiente para normalizar los niveles de colesterol. En este subgrupo de pacientes sería esperable por ello un mayor componente de aterosclerosis previa a la MFP, sobre la que, a su vez, actuarían los mecanismos protrombóticos asociados al SMPC una vez ha aparecido éste. En este sentido, cobra importancia la asociación a un mayor riesgo trombótico de la fase celular y la trombocitosis, ya que nos indicaría que

el subgrupo de pacientes con una forma hiperproliferativa de la MFP presentaría un mayor riesgo trombótico. Es posible que en la MFP operen los mismos mecanismos que intervienen en la patogenia de la trombosís de la PV y la TE. En esa direccióñ apuntan los resultados reportados por Tefferi et al(203) en una serie constituida de 157 pacientes con MFP en la que la frecuencia global de trombosís fue del 6%, asociándose la presencia de la mutación V617F de JAK2 a un riesgo mayor de trombosís, lo que sugiere una patogenia de la trombosís común a la MFP, la PV y la TE.

En conclusióñ, los resultados del presente estudio proporcionan por primera vez datos reales sobre la incidencia de trombosís en la MFP. En comparaci6n con la poblaci6n general, los pacientes con MFP presentan un riesgo mayor de presentar trombosís venosas profundas e infarto cerebral. Adem6s, las formas hiperproliferativas de la MFP y la presencia de factores de riesgo cardiovascular se asociaron con un riesgo m6s alto de trombosís. Estas observaciones deben tenerse en consideraci6n en el manejo de los pacientes con MFP

4.3. Aumento de la activación plaquetaria, leucocitaria y de la coagulación en la mielofibrosis primaria.

La trombosis constituye la principal complicación en los pacientes con PV y TE (42,217,220). En la MFP, en cambio, dicha complicación es mucho menos frecuente, pues ocurre al 11,6% de los pacientes (221). 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 PV y TE (44,46,82,84). Sin embargo, en la MFP la información disponible al respecto es muy limitada (81,82,222). En este sentido, el presente trabajo de investigación representa el estudio más amplio realizado sobre este tema en la MFP tanto por el número de pacientes analizados como por la cantidad de parámetros evaluados.

Previamente se había descrito que las plaquetas de los pacientes con MFP presentan anomalías de la membrana que dan lugar a una activación plaquetaria continuada y a una depleción de los gránulos alfa (223). Asimismo, Jensen et al (81) y Villmow et al (222) habían registrado un aumento de la expresión de P-selectina plaquetaria en condiciones basales, confirmando, por tanto, que en la MFP existe un cierto grado de activación plaquetaria, incluso cuando las plaquetas no se someten a ningún estímulo. En el presente estudio objetivamos un mayor porcentaje de plaquetas que expresaban P-selectina en los pacientes con MFP que en los controles sanos en condiciones basales. Sin embargo, el comportamiento de dichas plaquetas tras el estímulo con diferentes agonistas plaquetarios como el ADP, el ácido araquidónico o la trombina, fue similar al observado en los individuos sanos. Esta observación es

de interés, ya que en un estudio en el que se empleó idéntica metodología, realizado en pacientes con TE, los agonistas plaquetarios sí indujeron una expresión mayor de P-selectina en los pacientes que en los controles(84). De estos resultados se puede concluir que, aunque en la MFP existe un cierto grado de activación plaquetaria, dicha activación es menos manifiesta que la observada en otros SMPC con mayor tendencia trombótica, como la TE.

Los complejos leucocito-plaqueta, especialmente los complejos monocito-plaqueta, tienen propiedades trombogénicas. Así, el monocito, tras activarse, tiene la capacidad de sintetizar y liberar factor tisular que, como es conocido, es la primera proteína que interviene en la activación de la cascada de la coagulación a partir de la vía extrínseca (224). Pero, además, las plaquetas que están en íntimo contacto a estos complejos pueden aportar la superficie pro-coagulante necesaria para que se desarrolle la coagulación. Se ha descrito un incremento en el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes en los pacientes con SMPC. Dichos complejos se han correlacionado con la trombocitosis, con una mayor activación leucocitaria y plaquetaria, y con una mayor frecuencia de trombosis (46,82). En la PV se ha registrado que el 40-50% de los leucocitos circulan unidos a las plaquetas, mientras que en la TE dicho porcentaje es todavía mayor, alcanzando el 50-60% de los neutrófilos y hasta el 80% de los monocitos (46,84,225). Jensen et al (82) describieron que, al igual que en la PV y la TE, en la MFP también existe un porcentaje mayor de complejos leucocito-plaqueta circulantes que en controles sanos. Sin embargo, Villmow et al (222) no pudieron demostrar diferencias significativas al respecto entre pacientes con MFP e individuos control. En el presente trabajo observamos que en la MFP existe un incremento

de complejos leucocito-plaqueta circulantes, cuantificándose un 27% de complejos neutrófilo-plaqueta y un 67% de complejos monocito-plaqueta, si bien las diferencias sólo alcanzaron significación estadística para los complejos monocito-plaqueta. De todas formas, es importante destacar que ambos porcentajes son menores que los registrados en la PV y la TE. Estas diferencias podrían explicarse por la trombocitopenia que presentan muchos pacientes con MFP. La adhesión de los leucocitos a las plaquetas está mediada por la P-selectina presente en la plaqueta y por una glicoproteína de la membrana de los leucocitos que actúa como ligando. Un mecanismo alternativo para la unión entre leucocitos y plaquetas sería a través del antígeno CD11b granulocitario y las glicoproteínas Ib y IIb/IIIa de la plaqueta, para lo cual se requiere la presencia de fibrinógeno. Dado que la expresión de la P-selectina plaquetaria y del CD11b granulocitario están incrementadas en la MFP, ambos mecanismos podrían contribuir al aumento de la adhesividad entre leucocito y plaquetas que ocurre en la MFP.

En los pacientes con PV y TE se ha observado una sobreexpresión de CD11b granulocitario que se ha correlacionado con la presencia de parámetros de activación de la coagulación y con el antecedente de trombosis (44,84). Sin embargo, hasta la fecha, no se había estudiado el status de CD11b granulocitario en la MFP. En el presente estudio observamos una sobreexpresión de CD11b en los neutrófilos y los monocitos, tanto en condiciones basales como tras estímulo con LPS. Es importante destacar que esta sobreexpresión de CD11b se observó fundamentalmente en los pacientes portadores de la mutación V617F de JAK2, indicando, por tanto, que, directa o indirectamente, JAK2 está involucrado en la expresión de CD11b y, en

consecuencia, en la activación leucocitaria. Además, la expresión de CD11b observada en los pacientes con MFP fue mayor que la descrita por nuestro grupo en los sujetos con TE (84). Esta diferencia podría deberse a la mayor carga alélica de JAK2 que habitualmente presentan los pacientes con MFP. Al igual que se ha descrito en la PV y la TE, se observó una correlación significativa entre la sobreexpresión de CD11b y una mayor concentración plasmática de F1+2, considerado como marcador de activación de la coagulación.

Una posible implicación de la sobreexpresión de CD11b granulocitario sería la mayor adhesión entre leucocitos y megacariocitos, que facilitaría la emperipolesis. Se ha sugerido que la emperipolesis, fenómeno en el que los leucocitos y los precursores hematopoyéticos quedan rodeados por los megacariocitos, podría tener un papel en el desarrollo de la fibrosis medular. En la MFP existe un aumento de la emperipolesis de neutrófilos y eosinófilos, así como una mayor liberación de MPO por parte de los neutrófilos que habían sufrido este proceso (174). Asimismo, el grado de emperipolesis se ha correlacionado con el grado de fibrosis medular.

Los monocitos y macrófagos de los pacientes con MFP tienen una capacidad aumentada de producir TGF- β e IL-1, si bien su liberación sólo se produce tras adherirse a la matriz extracelular (129). Parece, pues, que la adhesión de los monocitos a las proteínas de la matriz extracelular podría desempeñar un papel en la liberación de citocinas fibrogénicas. En dicha interacción entre los monocitos y la matriz extracelular intervienen diferentes proteínas de adhesión del monocito, como CD44, cuyos ligandos son la fibronectina, el ácido hialurónico y el colágeno, o el propio CD11b (210-212). La

sobreexpresión de CD11b monocitario descrita en el presente estudio también podría facilitar, por tanto, la adhesión de los monocitos a la matriz extracelular, contribuyendo así a la aparición de la fibrosis.

Otro hallazgo del presente estudio fue el incremento de la concentración plasmática de TM en los pacientes con MFP, dato que sugiere la existencia de un daño endotelial continuo. En este sentido, la activación leucocitaria y plaquetaria da lugar a la liberación de proteasas, citocinas y radicales libres que pueden producir daño endotelial (226,227). La neoangiogénesis, tan característica de la MFP, o la liberación de TM a partir de los megacariocitos o los leucocitos podrían servir como explicación alternativa a este hallazgo(228).

Por último, todos los pacientes con MFP presentaron una concentración elevada de F1+2, marcador de activación de la coagulación, siendo, además, los valores significativamente más altos en los pacientes con la mutación V617F de JAK2. Por el contrario, no hubo diferencias entre pacientes y controles en cuanto a la concentración de dímero-D. Estos resultados indicarían que en la MFP existe una activación continua de la coagulación pero sin que ésta llegue a su paso final de formación de fibrina.

En conclusión, los pacientes con MFP presentan datos de activación leucocitaria, plaquetaria, endotelial y de la coagulación similares a los previamente descritos en los pacientes con PV y TE. Además, la expresión de CD11b y de F1+2 se correlaciona con la presencia de la mutación de JAK2.

5. CONCLUSIONES

1. La expresión del antígeno CD11b granulocitario está notablemente incrementada en los pacientes con PV que presentan síndrome de Budd-Chiari o trombosis del eje esplenoportal. Dicha alteración podría intervenir en la patogenia de la trombosis de la PV al facilitar la adhesión de los granulocitos al endotelio y las plaquetas.
2. En comparación con la población general, los pacientes con MFP presentan un riesgo aumentado de presentar trombosis venosas profundas e infarto cerebral.
3. En los sujetos con MFP el riesgo de trombosis es mayor en aquellos con formas hiperproliferativas de la enfermedad y en los que presentan factores de riesgo cardiovascular concomitantes.
4. Los pacientes con MFP presentan datos de activación leucocitaria, plaquetaria, endotelial y de la coagulación similares a los previamente descritos en los enfermos con PV y TE.
5. En la MFP la presencia de la mutación V617F del gen JAK2 se asocia a una sobreexpresión del antígeno CD11b y a una concentración plasmática elevada de F1+2.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295: 913-916.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365: 1054-1061.
3. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434: 1144-1148.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352: 1779-1790.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7: 387-397.
6. Zhao R, Xing S, Li Z ,et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280: 22788-22792.
7. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6: 372-375.
8. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974;290: 1382.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285: 1-24.
13. 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.
14. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93: 385-395.
15. 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.
16. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999;283: 990-993.
17. 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.

18. Seubert N, Royer Y, Staerk J, et al. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell* 2003;12: 1239-1250.
19. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74: 227-236.
20. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20: 3387-3395.
21. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999;98: 181-191.
22. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2002;30: 990-1000.
23. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004;32: 179-187.
24. 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.
25. 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.

26. Bumm TG, Elsea C, Corbin AS et al. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* 2006;66: 11156-11165.
27. 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.
28. 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 U S A* 2006;103: 6224-6229.
29. Lasho TL, Mesa R, Gilliland DG, Tefferi A. Mutation studies in CD3+, CD19+ and CD34+ cell fractions in myeloproliferative disorders with homozygous JAK2(V617F) in granulocytes. *Br J Haematol* 2005;130: 797-799.
30. Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11: 819-848.
31. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. 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.
32. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations and role in leukemic transformation. *Blood* 2006;108: 3548-3555.
33. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108: 346-352.

34. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005;106: 3374-3376.
35. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. 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.
36. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356: 459-468.
37. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007;21: 1960-1963.
38. Martinez-Avilés L, Besses C, Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007;92: 1717-1718.
39. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007;92: 1607-1614.
40. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol* 2007;35: 1641-1646.

41. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol* 1986;23: 132-143.
42. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Ann Intern Med* 1995;123: 656-664.
43. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet* 1978;2: 1219-1222.
44. 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.
45. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol* 2005;42: 239-247.
46. 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.
47. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350: 114-124.
48. Landolfi R, Di GL, Barbui T, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109: 2446-2452.
49. Najean Y, Mugnier P, Dresch C, Rain JD. Polycythaemia vera in young people: an analysis of 58 cases diagnosed before 40 years. *Br J Haematol* 1987;67: 285-291.

50. Kubota K, Tamura J, Shirakura T, et al. The behaviour of red cells in narrow tubes in vitro as a model of the microcirculation. *Br J Haematol* 1996;94: 266-272.
51. Turitto VT, Weiss HJ. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 1980;207: 541-543.
52. Thomas DJ, du Boulay GH, Marshall J, et al. Cerebral blood-flow in polycythaemia. *Lancet* 1977;2: 161-163.
53. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* 2002;100: 4272-4290.
54. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995;332: 1132-1136.
55. Dawson AA, Ogston D. The influence of the platelet count on the incidence of thrombotic and haemorrhagic complications in polycythaemia vera. *Postgrad Med J* 1970;46: 76-78.
56. Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leuk Lymphoma* 1996;22 Suppl 1: 71-78.
57. Kessler CM, Klein HG, Havlik RJ. Uncontrolled thrombocytosis in chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1982;50: 157-167.
58. Landolfi R, Ciabattini G, Patrignani P, et al. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood* 1992;80: 1965-1971.

59. 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.
60. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984;64: 1-12.
61. Di Nisio M, Barbui T, Di GL, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol* 2007;136: 249-259.
62. Landolfi R, Marchioli R. European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): a randomized trial. *Semin Thromb Hemost* 1997;23: 473-478.
63. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005;353: 33-45.
64. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1999;93: 2506-2514.
65. 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.
66. Westwood NB, Copson ER, Page LA, Mire-Sluis AR, Brown KA, Pearson TC. Activated phenotype in neutrophils and monocytes from patients with primary proliferative polycythaemia. *J Clin Pathol* 1995;48: 525-530.
67. Iki S, Yuo A, Yagisawa M, et al. 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.
68. Samuelsson J, Berg A. Further studies of the defective stimulus-response coupling for the oxidative burst in neutrophils in polycythemia vera. *Eur J Haematol* 1991;47: 239-245.
69. Samuelsson J, Hansson A, Rosendahl K, Palmblad J. Superoxide anion production and phospholipase D-mediated generation of diacylglycerol are subnormal after N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of polymorphonuclear granulocytes in polycythemia vera. *J Lab Clin Med* 1993;121: 310-319.
70. 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.
71. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A ,et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007;109: 2461-2469.
72. 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.
73. Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004;126: 298-306.
74. 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 U S A* 2000;97: 13835-13840.

75. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1: 12-17.
76. Maugeri N, Brambilla M, Camera M, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 2006;4: 1323-1330.
77. Maugeri N, de GG, Barbanti M, Donati MB, Cerletti C. Prevention of platelet-polymorphonuclear leukocyte interactions: new clues to the antithrombotic properties of parnaparin, a low molecular weight heparin. *Haematologica* 2005;90: 833-839.
78. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993;92: 559-570.
79. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007;109: 2461-2469.
80. 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;4: 2593-2598.
81. Jensen MK, de Nully BP, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000;110: 116-124.
82. Jensen MK, de Nully BP, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch 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.

83. 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.
84. 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.
85. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975;12: 339-351.
86. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2005;23: 2224-2232.
87. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 2005;105: 2664-2670.
88. Passamonti F, Brusamolino E, Lazzarino M, et al. Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: long-term results in 163 patients. *Haematologica* 2000;85: 1011-1018.
89. Chievitz E, Thiede T. Complications and causes of death in polycythaemia vera. *Acta Med Scand* 1962;172: 513-523.
90. Silverstein A, Gilbert H, Wasserman LR. Neurologic complications of polycythemia. *Ann Intern Med* 1962;57: 909-916.

91. Pearce JM, Chandrasekera CP, Ladusans EJ. Lacunar infarcts in polycythaemia with raised packed cell volumes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287: 935-936.
92. Stewart JA, Dundas R, Howard RS, Rudd AG, Wolfe CD. Ethnic differences in incidence of stroke: prospective study with stroke register. *BMJ* 1999;318: 967-971.
93. Edwards EA, Cooley MH. Peripheral vascular symptoms as the initial manifestation of polycythemia vera. *JAMA* 1970;214: 1463-1467.
94. Salem HH, van der Weyden MB, Koutts J, Firkin BG. Leg pain and platelet aggregates in thrombocythemic myeloproliferative disease. *JAMA* 1980;244: 1122-1123.
95. Fagrell B, Mellstedt H. Polycythemia vera as a cause of ischemic digital necrosis. *Acta Chir Scand* 1978;144: 129-132.
96. 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.
97. Kurzrock R, Cohen PR. Erythromelalgia: review of clinical characteristics and pathophysiology. *Am J Med* 1991;91: 416-422.
98. Menon KV, Shah V, Kamath PS. The Budd-Chiari syndrome. *N Engl J Med* 2004;350: 578-585.
99. Mitchell MC, Boitnott JK, Kaufman S, Cameron JL, Maddrey WC. Budd-Chiari syndrome: etiology, diagnosis and management. *Medicine (Baltimore)* 1982;61: 199-218.

100. Lamy T, Devillers A, Bernard M, et al. Inapparent polycythemia vera: an unrecognized diagnosis. *Am J Med* 1997;102: 14-20.
101. Valla D, Casadevall N, Lacombe C, et al. Primary myeloproliferative disorder and hepatic vein thrombosis. A prospective study of erythroid colony formation in vitro in 20 patients with Budd-Chiari syndrome. *Ann Intern Med* 1985;103: 329-334.
102. Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, et al. Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol* 2005;129: 553-560.
103. 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.
104. Denninger MH, Chait Y, Casadevall N, et al. Cause of portal or hepatic venous thrombosis in adults: the role of multiple concurrent factors. *Hepatology* 2000;31: 587-591.
105. Valla D, Casadevall N, Huisse MG, et al. Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology* 1988;94: 1063-1069.
106. Primignani M, Martinelli I, Bucciarelli P et al. Risk factors for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology* 2005;41: 603-608.
107. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek F, et al. Role of JAK2 mutation deletion in Budd-Chiari Syndrome (BCS) and portal vein thrombosis associated to MPD. *Blood* 108, 377. 2006. (Abstract)

108. 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.
109. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, et al. Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 2006;130: 2031-2038.
110. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006;44: 1528-1534.
111. 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.
112. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106: 631-635.
113. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007;110: 840-846.
114. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21: 1952-1959.

115. Lucas GS, Padua RA, Masters GS, Oscier DG, Jacobs A. The application of X-chromosome gene probes to the diagnosis of myeloproliferative disease. *Br J Haematol* 1989;72: 530-533.
116. Anger B, Janssen JW, Schrezenmeier H, Hehlmann R, Heimpel H, Bartram CR. Clonal analysis of chronic myeloproliferative disorders using X-linked DNA polymorphisms. *Leukemia* 1990;4: 258-261.
117. Greenberg BR, Woo L, Veomett IC, Payne CM, Ahmann FR. Cytogenetics of bone marrow fibroblastic cells in idiopathic chronic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1987;66: 487-490.
118. Kreipe H, Jaquet K, Felgner J, Radzun HJ, Parwaresch MR. Clonal granulocytes and bone marrow cells in the cellular phase of agnogenic myeloid metaplasia. *Blood* 1991;78: 1814-1817.
119. Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia* 1988;2: 658-660.
120. Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101: 1981-1983.
121. Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1992;80: 184-188.
122. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, et al. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol* 1994;86: 253-258.

123. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51: 189-194.
124. Ruutu T, Partanen S, Knuutila S. Clonal karyotype abnormalities in erythroid and granulocyte-monocyte precursors in polycythaemia vera and myelofibrosis. *Scand J Haematol* 1983;31: 253-256.
125. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, et al. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1982;59: 1046-1054.
126. Thiele J, Braeckel C, Wagner S, et al. Macrophages in normal human bone marrow and in chronic myeloproliferative disorders: an immunohistochemical and morphometric study by a new monoclonal antibody (PG-M1) on trephine biopsies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421: 33-39.
127. Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. *Blood Rev* 1997;11: 233-242.
128. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2000;96: 3374-3380.
129. Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascon P. Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol* 1994;153: 2819-2830.
130. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood* 1981;57: 781-787.

131. Martyre MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1994;88: 9-16.
132. Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, et al. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997;97: 441-448.
133. Yanagida M, Ide Y, Imai A, et al. The role of transforming growth factor-beta in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. *Br J Haematol* 1997;99: 739-745.
134. Kimura A, Katoh O, Hyodo H, Kuramoto A. Transforming growth factor-beta regulates growth as well as collagen and fibronectin synthesis of human marrow fibroblasts. *Br J Haematol* 1989;72: 486-491.
135. Dalley A, Smith JM, Reilly JT, Neil SM. Investigation of calmodulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence for a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. *Br J Haematol* 1996;93: 856-862.
136. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 663-668.
137. Cervantes F, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Rozman M, Carreras E, Montserrat E. Complete remission of idiopathic myelofibrosis following donor lymphocyte infusion after failure of allogeneic transplantation: demonstration of a graft-versus-myelofibrosis effect. *Bone Marrow Transplant* 2000;26: 697-699.
138. Dokal I, Jones L, Deenmamode M, Lewis SM, Goldman JM. Allogeneic bone marrow transplantation for primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 1989;71: 158-160.

139. Guardiola P, Anderson JE, Bandini G, et al. Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Societe Francaise de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study. *Blood* 1999;93: 2831-2838.
140. Hibbin JA, Njoku OS, Matutes E, Lewis SM, Goldman JM. Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1984;57: 495-503.
141. Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, et al. Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 1987;70: 1014-1019.
142. Han ZC, Briere J, Nedellec G, et al. Characteristics of circulating megakaryocyte progenitors (CFU-MK) in patients with primary myelofibrosis. *Eur J Haematol* 1988;40: 130-135.
143. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98: 3249-3255.
144. Thiele J, Kvasnicka HM, Czeslick C. CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. *Ann Hematol* 2002;81: 86-89.
145. Andreasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2002;68: 189-193.

146. Taksin AL, Couedic JP, Dusanter-Fourt I, et al. 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.
147. Le Bousse-Kerdiles MC, Martyre MC. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Ann Hematol* 1999;78: 437-444.
148. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Clonal dominance at the progenitor level defines clinical phenotype more accurately than the neutrophil allele burden in JAK2 V617F-positive MPD patients. *Blood* 110, 209. 2007. (Abstract)
149. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;109: 71-77.
150. Xu M, Bruno E, Chao J, et al. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2005;105: 1699-1705.
151. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;110: 986-993.
152. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med* 2006;3: e270.
153. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108: 3472-3476.
154. Chaligne R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007;110: 3735-3743.

155. Al-Assar O, Ul-Hassan A, Brown R, Wilson GA, Hammond DW, Reilly JT. Gains on 9p are common genomic aberrations in idiopathic myelofibrosis: a comparative genomic hybridization study. *Br J Haematol* 2005;129: 66-71.
156. Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, et al. Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 2005;130: 229-232.
157. Ward HP, Block MH. The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine (Baltimore)* 1971;50: 357-420.
158. Wolf BC, Luevano E, Neiman RS. Evidence to suggest that the human fetal spleen is not a hematopoietic organ. *Am J Clin Pathol* 1983;80: 140-144.
159. Thiele J, Rompcik V, Wagner S, Fischer R. Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow. *Br J Haematol* 1992;80: 227-234.
160. Charbord P. Increased vascularity of bone marrow in myelofibrosis. *Br J Haematol* 1986;62: 595-596.
161. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 2000;157: 15-19.
162. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia* 2001;15: 976-980.

163. Musolino C, Calabro' L, Bellomo G, et al. Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2002;69: 159-163.
164. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002;100: 3203-3208.
165. Groopman JE. The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Ann Intern Med* 1980;92: 857-858.
166. Kimura A, Katoh O, Kuramoto A. Effects of platelet derived growth factor, epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on the growth of human marrow fibroblasts. *Br J Haematol* 1988;69: 9-12.
167. Katoh O, Kimura A, Kuramoto A. Platelet-derived growth factor is decreased in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1988;27: 276-280.
168. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987;247: 597-604.
169. Kimura A, Katoh O, Kuramoto A. Marrow fibroblasts from patients with myeloproliferative disorders show increased sensitivity to human serum mitogens. *Br J Haematol* 1988;69: 153-156.
170. Martyre MC, Magdelenat H, Bryckaert MC, Laine-Bidron C, Calvo F. Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1991;77: 80-86.

171. Eastham JM, Reilly JT, Mac NS. Raised urinary calmodulin levels in idiopathic myelofibrosis: possible implications for the aetiology of fibrosis. *Br J Haematol* 1994;86: 668-670.
172. Yan XQ, Lacey D, Hill D, et al. A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice induced by overexpressing thrombopoietin (mpl ligand): reversal of disease by bone marrow transplantation. *Blood* 1996;88: 402-409.
173. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, et al. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood* 1995;86: 4025-4033.
174. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000;96: 1342-1347.
175. Rameshwar P, Narayanan R, Qian J, Denny TN, Colon C, Gascon P. NF-kappa B as a central mediator in the induction of TGF-beta in monocytes from patients with idiopathic myelofibrosis: an inflammatory response beyond the realm of homeostasis. *J Immunol* 2000;165: 2271-2277.
176. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Cobo F, Rozman C, Montserrat E. Idiopathic myelofibrosis: initial features, evolutive patterns and survival in a series of 106 patients. *Med Clin (Barc)* 1997;109: 651-655.
177. Visani G, Finelli C, Castelli U, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol* 1990;75: 4-9.

178. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine (Baltimore)* 1983;62: 353-371.
179. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol* 1999;17: 2954-2970.
180. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342: 1255-1265.
181. Silverstein MN, Gomes MR, ReMine WH, Elveback LR. Agnogenic myeloid metaplasia. Natural history and treatment. *Arch Intern Med* 1967;120: 546-550.
182. Didisheim P, Bunting D. Abnormal platelet function in myelofibrosis. *Am J Clin Pathol* 1966;45: 566-573.
183. Balduini CL, Bertolino G, Gamba G, et al. Platelet aggregation in platelet rich plasma and whole blood in 18 patients affected by idiopathic myelofibrosis. *Eur J Haematol* 1988;41: 267-272.
184. Lara JF, Rosen PP. Extramedullary hematopoiesis in a bronchial carcinoid tumor. An unusual complication of agnogenic myeloid metaplasia. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114: 1283-1285.
185. Landolfi R, Colosimo C, De Candia E, et al. Meningeal hematopoiesis causing exophthalmus and hemiparesis in myelofibrosis: effect of radiotherapy. A case report. *Cancer* 1988;62: 2346-2349.
186. Oesterling JE, Keating JP, Leroy AJ, et al. Idiopathic myelofibrosis with myeloid metaplasia involving the renal pelves, ureters and bladder. *J Urol* 1992;147: 1360-1362.

187. Fedeli G, Certo M, Cannizzaro O, et al. Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis. *Am J Gastroenterol* 1990;85: 1512-1514.
188. Gorshein D, Brauer MJ. Ascites in myeloid metaplasia due to ectopic peritoneal implantations. *Cancer* 1969;23: 1408-1412.
189. Liote F, Yeni P, Teillet-Thiebaud F, et al. Ascites revealing peritoneal and hepatic extramedullary hematopoiesis with peliosis in agnogenic myeloid metaplasia: case report and review of the literature. *Am J Med* 1991;90: 111-117.
190. Silverstein MN, Wollaeger EE, Baggenstoss AH. Gastrointestinal and abdominal manifestations of agnogenic myeloid metaplasia. *Arch Intern Med* 1973;131: 532-537.
191. Pereira A, Bruguera M, Cervantes F, Rozman C. Liver involvement at diagnosis of primary myelofibrosis: a clinicopathological study of twenty-two cases. *Eur J Haematol* 1988;40: 355-361.
192. Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, Bernier V. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology* 1990;12: 1166-1174.
193. Ligumski M, Polliack A, Benbassat J. Nature and incidence of liver involvement in agnogenic myeloid metaplasia. *Scand J Haematol* 1978;21: 81-93.
194. Escartín Marín P, Arenas Mirave JI, Boixeda D, Hernandez RF, Garcia PA. Hemodynamic study of the portal system in 6 cases of myeloid metaplasia. *Rev Clin Esp* 1977;145: 271-273.

195. Roux D, Merlio JP, Quinton A, Lamouliatte H, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Agnogenic myeloid metaplasia, portal hypertension, and sinusoidal abnormalities. *Gastroenterology* 1987;92: 1067-1072.
196. Dubois A, Dauzat M, Pignodel C, et al. Portal hypertension in lymphoproliferative and myeloproliferative disorders: hemodynamic and histological correlations. *Hepatology* 1993;17: 246-250.
197. Lee WC, Lin HC, Tsay SH, et al. Esophageal variceal ligation for esophageal variceal hemorrhage in a patient with portal and primary pulmonary hypertension complicating myelofibrosis. *Dig Dis Sci* 2001;46: 915-919.
198. Alvarez-Larrán A, Abrales JG, Cervantes F, et al. Portal hypertension secondary to myelofibrosis: a study of three cases. *Am J Gastroenterol* 2005;100: 2355-2358.
199. Garcia-Manero G, Schuster SJ, Patrick H, Martinez J. Pulmonary hypertension in patients with myelofibrosis secondary to myeloproliferative diseases. *Am J Hematol* 1999;60: 130-135.
200. Dingli D, Utz JP, Krowka MJ, Oberg AL, Tefferi A. Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. *Chest* 2001;120: 801-808.
201. Brodmann S, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A, Skoda RC. Myeloproliferative disorders: complications, survival and causes of death. *Ann Hematol* 2000;79: 312-318.
202. 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.

203. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM et al. The JAK2 tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 2005;131: 320-328.
204. Fujita F, Lyass S, Otsuka K, et al. Portal vein thrombosis following splenectomy: identification of risk factors. *Am Surg* 2003;69: 951-956.
205. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood* 2000;95: 2226-2233.
206. Kudo M. Budd-Chiari syndrome and myeloproliferative disorder. *Intern Med* 1996;35: 837-838.
207. Perelló A, García-Pagán JC, Gilabert R, et al. TIPS is a useful long-term derivative therapy for patients with Budd-Chiari syndrome uncontrolled by medical therapy. *Hepatology* 2002;35: 132-139.
208. Hoffman R, Nimer A, Lanir N, Brenner B, Baruch Y. Budd-Chiari syndrome associated with factor V leiden mutation: a report of 6 patients. *Liver Transpl Surg* 1999;5: 96-100.
209. 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.
210. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989;83: 2008-2017.

211. Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 1505-1509.
212. Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1995;130: 1473-1482.
213. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000;192: 193-204.
214. McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86: 746-756.
215. Alvarez-Larrán A, Toll T, Rives S, Estella J. Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. *Clin Lab Haematol* 2005;27: 41-46.
216. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997;97: 635-640.
217. Besses C, Cervantes F, Pereira A, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999;13: 150-154.
218. Akpek G, McAneny D, Weintraub L. Risks and benefits of splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a retrospective analysis of 26 cases. *J Surg Oncol* 2001;77: 42-48.

219. Loring LA, Panicek DM, Karpeh MS. Portal system thrombosis after splenectomy for neoplasm or chronic hematologic disorder: is routine surveillance imaging necessary? *J Comput Assist Tomogr* 1998;22: 856-860.
220. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2005;128: 275-290.
221. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia* 2006;20: 55-60.
222. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res* 2002;108: 139-145.
223. Leoni P, Rupoli S, Lai G, et al. Platelet abnormalities in idiopathic myelofibrosis: functional, biochemical and immunomorphological correlations. *Haematologica* 1994;79: 29-39.
224. Engstad CS, Lia K, Rekdal O, Olsen JO, Osterud B. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J Leukoc Biol* 1995;58: 575-581.
225. Alvarez-Larrán A, García-Pagán JC, Abrales JG, et al. Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004;124: 329-335.
226. Boehme MW, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 2002;107: 340-349.

227. 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.
228. Jensen MK, Riisbro R, de Nully BP, Brunner N, Hasselbalch HC. Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma from patients with idiopathic myelofibrosis or polycythaemia vera. *Eur J Haematol* 2002;69: 43-49.