

# Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis

Adriana Elizabeth González-Villalva,\* Carlos Iván Falcón-Rodríguez y Teresa Imelda Fortoul-van der Goes

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

—Recibido en su versión modificada: 10 de febrero de 2010

—Aceptado: 12 de febrero de 2010

## RESUMEN

*La hematotoxicología es un área poco estudiada en nuestro país y es limitado el conocimiento sobre el efecto que ciertos contaminantes atmosféricos inducen en la sangre y en la médula ósea. La contaminación por partículas suspendidas ha cobrado más interés, por los contaminantes que se adhieren a su superficie. Un ejemplo es el benceno, relacionado con aplasia medular y leucemia. Algunos metales que también están en las partículas inhaladas son hematotóxicos. Uno de ellos es el vanadio, que nuestro grupo ha identificado como un agente inductor de alteraciones en la megacariopoyesis, lo que motivó esta revisión. Las plaquetas desempeñan un papel muy importante en la hemostasia y derivan de la célula más grande de la médula ósea: el megacariocito. Hasta hace algunos años desconocíamos casi todo del megacariocito, pero con la clonación de la trombopoyetina, en 1994, la principal hormona reguladora de la producción plaquetaria, ha existido un desarrollo acelerado en el conocimiento de la megacariopoyesis. Este artículo hace una revisión de la megacariopoyesis y su regulación, con énfasis en las vías de señalización implicadas. Además, se mencionan algunas enfermedades relacionadas y se discuten las perspectivas de investigación de este proceso, con énfasis en la toxicología.*

### Palabras clave:

*Megacariopoyesis, plaquetas, trombopoyetina, señalización*

## SUMMARY

*Hematotoxicology has been studied with less interest than other fields associated with atmospheric pollution. There is limited knowledge about on the effects that certain atmospheric pollutants may provoke in the blood and bone marrow. Suspended particle pollution has become an area of scientific inquiry due to the contaminants adhering to its surface. We have identified the association of inhaled vanadium and variations in megakaryopoyesis and thrombopoyesis. Platelets are the smallest elements in the blood, but they play a strategic role in hemostasis. They are derived from the largest cell of the bone marrow, the megakaryocyte. This cell size is about 150µm, with a polyploid nucleus and unknown origin until few years ago. When TPO was cloned in 1994 the knowledge about megakaryocyte began to grow exponentially, elucidating the mechanisms of proliferation, differentiation and release of platelets. More information is still needed in order to translate knowledge into clinical application for diseases such as thrombocytopenia or thrombocytosis. A review of the current concepts of megakaryopoyesis and its regulation, with emphasis on signaling pathways are presented in this paper; a classification in TPO-dependent and TPO-independent is also detailed. In addition, we review some diseases associated with changes in the signaling pathway of megakaryopoyesis, as well as possible perspectives in this field, including toxicology.*

### Key words:

*Megakaryopoyesis, platelets, TPO, signaling pathways*

## Introducción

Entre las consecuencias que el desarrollo no planeado ha dejado a la humanidad, además del confort, están las múltiples repercusiones que sus residuos dejan en el ambiente. La velocidad y la comodidad en el transporte han generado la liberación a la atmósfera de gran cantidad de partículas, que quedan suspendidas en el aire y se inhalan. De acuerdo con su tamaño y composición, las partículas suspendidas se han clasificado en las que se pueden inhalar y de acuerdo con su tamaño se identifica el sitio del tracto respiratorio al que pueden llegar. Lo relevante de estas partículas es lo que acarrearán en su superficie, ya que ahí se

han identificado compuestos orgánicos volátiles y metales. Estos últimos son el interés de nuestro grupo de trabajo, en especial el vanadio, elemento liberado a la atmósfera como consecuencia de la quema de combustibles de origen orgánico, en especial de los combustibles cuyo origen es el petróleo mexicano, el venezolano o kwaitiano.<sup>1</sup>

Este elemento indujo en nuestro modelo animal megacariocitosis y trombocitosis.<sup>2-6</sup> El hallazgo nos condujo a identificar los mecanismos por los cuales se producen estas alteraciones, y como consecuencia exploramos las vías normales de señalización que nos permitirán tener un mejor conocimiento de la regulación de este fenómeno, como la producción de megacariocitos y plaquetas.

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Adriana Elizabeth González-Villalva. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, edificio A, piso 3, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, 04510 México D.F., México. Tel.: (55) 5623 2184. Correo electrónico: hemadgovi@yahoo.com.mx

Las plaquetas son indispensables para la hemostasia, ya que son las encargadas de facilitar la reparación de las pequeñas rupturas que suceden a diario en los vasos sanguíneos de pequeño calibre y, en el caso de heridas más grandes, son totalmente indispensables para formar el coágulo primario que sirve para detener de manera inmediata la pérdida de sangre porque pueden adherirse a la colágena del subendotelio expuesto y agregarse entre ellas. Además, su membrana lipídica sirve como base para que se anclen ahí los factores de coagulación, cuya activación culmina con la formación de fibrina que le da estabilidad al coágulo, lo que facilita la reparación del vaso sanguíneo dañado. Otras funciones menos conocidas están relacionadas con la reparación de heridas, la respuesta inmunológica innata y la biología de las metástasis tumorales, ya que se ha demostrado que los pacientes con cáncer y elevadas cuentas plaquetarias tienen más riesgo de metástasis.<sup>7,8</sup> Poco son estudiadas las funciones de las plaquetas, como su actividad fagocítica o bactericida, o su papel en la inflamación; sin embargo, existen nuevos conocimientos que revelan la importancia de las plaquetas en estos y otros procesos.<sup>9</sup>

Las plaquetas son fragmentos del citoplasma de una célula de médula ósea muy grande, el megacariocito. Tienen forma de disco en su forma inactiva y miden dos a cuatro micrómetros de diámetro. La cuenta plaquetaria en humanos varía en un rango normal de 150 a 400 × 10<sup>9</sup> /l. La vida media de las plaquetas es de siete a 14 días y, para mantener los valores normales en sangre se producen aproximadamente 1 × 10<sup>11</sup> plaquetas diariamente en médula ósea. Las alteraciones tanto en la cantidad como en la calidad plaquetaria dan lugar a patologías muy diversas ligadas con eventos trombohemorrágicos. Por citar algunos ejemplos: la trombocitopenia, o disminución del número de plaquetas en sangre, cuyas causas pueden ser diversas, predispone a hemorragias, sobre todo de piel y mucosas, pero puede llegar a poner en riesgo la vida si las cuentas son muy bajas; por otro lado, la trombocitosis, o aumento en el número de plaquetas en sangre, puede aumentar el riesgo de eventos trombóticos. De hecho, existe evidencia de que adultos con rangos normales en el cuartil superior tienen dos veces más probabilidades de un evento cardiovascular trombótico.<sup>10</sup>

Pero no solo las alteraciones cuantitativas de las plaquetas son importantes, también algunos padecimientos en los que la calidad de las plaquetas es deficiente predisponen a los pacientes a hemorragias, como la enfermedad de Bernard-Soulier, en la cual existen mutaciones en el complejo glucoproteína Ib/V/IX que resulta en macrotrombocitopenia. Debido a que esta glucoproteína es importante para la agregación, estas plaquetas presentan un mal funcionamiento.<sup>11</sup>

Como consecuencia de la importancia que las plaquetas representan, es relevante conocer los mecanismos que controlan su producción para entender el origen de las enfermedades y, posteriormente, incidir de manera terapéutica en los pacientes con enfermedades relacionadas con ellas. Esta revisión pretende hacer una actualización de la megacariopoyesis y de las vías de señalización involucradas en el proceso.

## Megacariopoyesis y trombopoyesis

Se llama megacariopoyesis al proceso de diferenciación de la línea megacariocítica, y trombopoyesis al proceso de liberación de plaquetas a partir del citoplasma del megacariocito maduro. Cabe mencionar que algunos autores consideran estos dos términos como sinónimos. Estos procesos se llevan a cabo en médula ósea, aunque existen algunos autores que proponen que el pulmón es uno de los sitios donde ocurre trombopoyesis y se le postula como uno de los sitios importantes para la liberación de plaquetas a la sangre.<sup>12</sup>

El megacariocito es una célula enorme, 10 veces más grande que el resto de células de médula ósea, mide hasta 150 μm de diámetro debido a que presenta un proceso llamado endomitosis, en el cual la célula duplica su material genético y tiene mitosis pero sin cariocinesis ni citocinesis, por lo que es de gran tamaño y con núcleo poliploide, llega a tener hasta 64 n de material genético, de hecho debe su nombre a esta característica (*mega* = grande; *karyo* = núcleo). La poliploidía de la célula aparentemente es necesaria para la subsecuente acumulación de citoplasma para liberar una adecuada cantidad de plaquetas. Este citoplasma es muy granular, contiene gránulos alfa y densos que tienen sustancias importantes para la activación y agregación plaquetaria. El citoplasma del megacariocito se fragmenta para dar lugar a miles de plaquetas; se dice que cada megacariocito maduro puede dar lugar a 10<sup>4</sup> plaquetas<sup>9</sup> (Figura 1).

El megacariocito deriva de una célula de la médula ósea llamada célula troncal hematopoyética, la cual tiene la capacidad de autorrenovarse, es multipotencial y se ha encontrado que en su superficie expresa antígenos como CD34, CD90, CD117 y CD133 y carece de la expresión de antígenos de linajes específicos. Estas células dan origen a células progenitoras hematopoyéticas que pierden la capacidad de renovación, pero siguen conservando su multipotencialidad, bipotencialidad o monopotencialidad, según sea el caso, puesto que si bien aún conservan el antígeno CD34, ya expresan antígenos del linaje al cual darán origen. La célula



**Figura 1.** Ultraestructura de un megacariocito maduro. Se observa su núcleo y citoplasma muy granular, así como los canales de demarcación que darán lugar a las pro plaquetas. Médula ósea de ratón. Micrografía electrónica de transmisión.

progenitora multipotente da origen al PLC (progenitor linfocítico común) y al PMC (progenitor mieloide común), que da origen a las PGM (progenitores granulocito/monocíticos) y PEM (progenitores eritroides/megacariocíticos).

La diferenciación de progenitores a células precursoras depende de la activación de genes específicos para cada linaje en particular, como de la presencia de diversos factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, las cuales determinan el destino de cada célula en particular. PU1, junto con los factores de transcripción GATA1, GATA2 y FOG, son esenciales para la maduración y diferenciación eritroide y megacariocítica.<sup>13</sup> Existen estudios recientes en los que las células troncales hematopoyéticas FLT3 positivas no produjeron eritrocitos ni megacariocitos *in vivo* ni *in vitro*, por lo que se postula que la células troncales hematopoyéticas FLT3 negativa puede dar origen directamente a la célula PEM.<sup>14</sup>

La célula bipotencial megacariocítica-eritroide PEM da lugar a la unidad formadora de brotes de megacariocitos o BFU-Meg, que se diferencia de la unidad formadora de colonias de megacariocitos o CFU-Meg.<sup>15-17</sup> Los marcadores de las CFU-Meg y BFU-Meg que indican que ya se diferenció a línea megacariocítica son CD34, CD33 y CD41. De importancia especial es el CD41 (glicoproteína IIb), un marcador específico de este linaje. La primera célula identificable de la línea megacariocítica es el pro megacarioblasto. Esta célula, de 15 a 50 µm de diámetro, con un núcleo ovalado o arriñonado, tiene dos juegos de cromosomas (4N) y el citoplasma muy basófilo, ya que tiene una gran cantidad de ribosomas, pero aún no presenta gránulos. Esta célula es acetilcolina esterasa positiva. El pro megacariocito mide 20 a 80 µm de diámetro con un citoplasma menos basófilo, pero ya con presencia de gránulos. El megacariocito es la célula

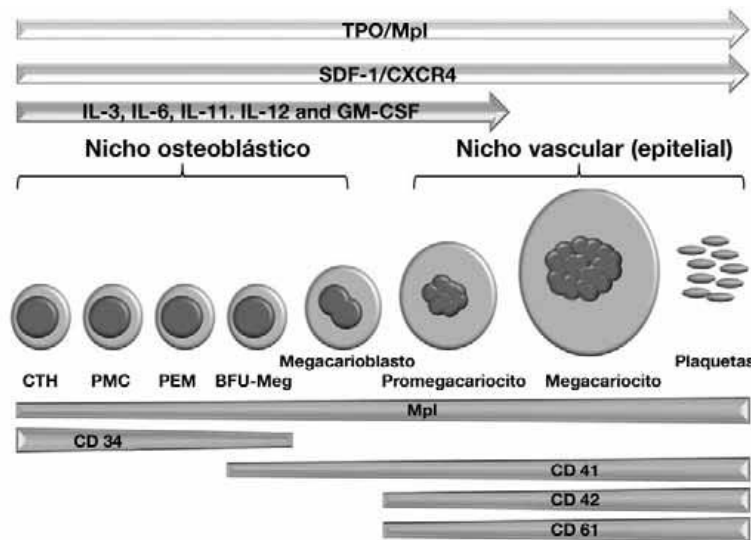
más grande de la médula ósea con diámetro de hasta 150 µm, presenta un núcleo multilobulado (hasta 64N), un citoplasma basófilo y con abundantes gránulos. A partir del pro megacarioblasto ya tiene los antígenos de superficie CD41, CD42 (glucoproteína Ib) y CD61 (glucoproteína IIIa), así como el factor de von Willebrand<sup>18,19</sup> (Figura 2).

La liberación de las plaquetas a la sangre se parece al proceso de la apoptosis, se observan protrusiones citoplásmicas, fragmentación del citoplasma y existe activación de caspasas.<sup>20</sup> Se extienden largas prolongaciones de citoplasma, las pro plaquetas, y esto involucra la reorganización de filamentos de actina seguida de la extensión de microtúbulos en los que está involucrada la tubulina β1, dependiente de NF-E2, parte esencial del proceso. Este conocimiento se adquirió en parte gracias a la videomicroscopia, que permitió ver que es un proceso dinámico donde hay extensión y retracción de las pro plaquetas. Incluso se forman ramificaciones para dar lugar a mayor número de extremos libres, de donde se desprenden las plaquetas maduras. Recientemente se ha utilizado la microscopia intravital utilizando fluorescencia, que ha permitido comprobar que esto ocurre no solo en cultivos *in vitro* sino también en condiciones *in vivo*.<sup>21-24</sup>

### Citocinas y quimiocinas y las vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis

#### Megacariopoyesis dependiente de trombopoyetina

La principal hormona reguladora de la producción plaquetaria es la TPO, glucoproteína de 353 aminoácidos con peso



**Figura 2.** En la parte superior, con flechas, las citocinas y quimiocinas más importantes que activan el proceso de maduración y diferenciación de los megacariocitos. Con llaves se hace notar en qué sitio se lleva a cabo la diferenciación del megacariocito, recordando el papel fundamental de SDF1 y FGF4 en la migración hacia el nicho vascular. En la parte inferior, los marcadores de superficie de acuerdo con la etapa de maduración de los megacariocitos.

molecular de 30 kDa, que comparte cierta homología con la eritropoyetina; su gen está localizado en el cromosoma 3q27. La TPO es producida principalmente en el hígado (en hepatocitos), riñón (en células de túbulos contorneados) y estroma de la médula ósea. También existen informes en los que se demuestra producción de TPO en células musculares lisas, pulmón, cerebro, ovario y testículo, por lo que se sugiere que debe tener alguna función en esos tejidos, actualmente desconocida.<sup>25,26</sup> Su receptor es el protooncogen celular Mpl. El descubrimiento de esta hormona es muy reciente, en 1986 se identificó el virus de la leucemia murina mieloproliferativa,<sup>27</sup> y el oncogen v-Mpl responsable de esta mieloproliferación en 1990. En 1992 se descubrió el protooncogen celular c-Mpl,<sup>28</sup> que resultó ser de la familia de receptores de citocinas hematopoyéticas, pero se desconocía su ligando; fue hasta 1994 cuando varios grupos al mismo tiempo lograron clonar este ligando, ahora conocido como TPO.<sup>29,30</sup>

Los niveles aumentados de TPO ocasionados por sobreexpresión genética en ratones transgénicos tienen como consecuencia aumento en las colonias de precursores megacariocíticos, incremento en el número de megacariocitos y en su tamaño, así como en el número de plaquetas y en su volumen. También se observa leve anemia en estos ratones, por lo que se postula que TPO desvía la diferenciación de la célula madre bipotencial (PEM) hacia megacariocitos a expensas de la línea eritroide.<sup>31</sup> La administración exógena de TPO también produce megacariocitosis y trombocitosis,<sup>32</sup> y en estudios de agregometría se ha observado que aumenta la activación plaquetaria ante diferentes agonistas.<sup>33</sup>

Después de numerosas investigaciones se ha visto que los niveles de TPO en sangre y médula ósea son inversamente proporcionales a la cuenta plaquetaria, aunque existen algunas excepciones como la trombocitopenia por destrucción plaquetaria, en la que no están elevados como se podría esperar, y en la trombocitosis reactiva secundaria a inflamación, en la que se esperaría un nivel de TPO bajo, sin embargo, ocurre lo contrario. La regulación de los niveles de TPO se basa principalmente en la unión a su receptor Mpl, su internalización y destrucción.<sup>34</sup> Existen receptores Mpl tanto en megacariocitos como en plaquetas circulantes. Si aumenta el número de plaquetas, aumenta el número de receptores en su superficie y, por lo tanto, disminuye la TPO. En cambio, si disminuye el número de plaquetas disminuye también el número de receptores y la TPO aumenta en sangre porque queda libre y puede actuar en los megacariocitos de médula ósea para estimular la producción plaquetaria. Aunque se ha demostrado que las células endoteliales tienen receptores Mpl, esto no afecta los niveles de TPO.<sup>3</sup>

La producción de TPO por el hígado y el riñón aparentemente es constitutiva y no aumenta ni disminuye ante los cambios en el número de plaquetas circulantes. En algunos casos puede estar aumentada la producción de TPO, como en la trombocitosis reactiva secundaria a inflamación, caracterizada por el aumento en el TNF $\alpha$  que estimula el aumento de IL6 y se ha demostrado que esta interleucina estimula la transcripción de TPO en el hígado.<sup>35</sup> Otro factor que estimula su producción en hígado es el factor de crecimiento de hepatocitos. Algunos factores que aumentan la producción de TPO en

células del estroma de médula ósea son el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y FGF2 (factor de crecimiento fibroblástico-2). Otros factores la disminuyen, como el TGF $\beta$ , factor-4 plaquetario, trombospondina, etcétera.

La TPO ejerce sus efectos a través de su receptor Mpl. Los eventos de fosforilación de tirosina son esenciales para el inicio de esta vía de señalización y Mpl no tiene actividad de tirosincinasa. Este receptor tiene sitios llamados caja 1 y caja 2 en su extremo proximal a la membrana, donde se une constitutivamente la tirosincinasa JAK2 (Janus cinasa 2), aún en estado inactivo. Las JAK tienen tres dominios importantes: JH1, que tiene la actividad de tirosincinasa; JH2, regulador de la tirosincinasa o pseudocinasa; y FERM, que se une al dominio citoplásmico del receptor Mpl. Al unirse la TPO a Mpl, éste se dimeriza y JAK2 se transfosforila y fosforila ciertas tirosinas específicas en la región distal del receptor para que sirvan como sitios de unión para proteínas que serán fosforiladas por la misma JAK2, como STAT3 y STAT5, que se unen a las tirosinas 112 y 117.<sup>36</sup>

STAT3 y STAT5 fosforiladas forman homodímeros y se translocan al núcleo para servir como factores de transcripción que activan genes que promueven la supervivencia e inhiben la apoptosis, como Bcl-xl, p27, p21, ciclina D1, etcétera.<sup>25,37</sup> También el adaptador Shc se une a la tirosina-112 fosforilada de Mpl y al ser fosforilado por JAK2 recluta a Grb2 fosforilada, que junto con GEF y SOS activan a Ras. La activación de Ras lleva al reclutamiento de la serina-treonina cinasa Raf y a la activación de la MAPK ERK. Se ha propuesto que la activación transitoria de MAPK promueve proliferación, pero en la activación prolongada promueve la diferenciación de los megacariocitos. En la señalización por TPO se han visto implicadas dos vías de MAPK: p42/44 ERK1, ERK2 y p38. Ambas vías inducen la transcripción del factor HoxB4 y la translocación de HoxA9 al núcleo con lo se favorece la expansión de células troncales hematopoyéticas.<sup>38,39</sup> ERK 1/2 induce la proliferación y poliploidización de los megacariocitos<sup>40</sup> y aumenta la activación plaquetaria inducida por trombina.<sup>41,42</sup>

Además de estimular la vía de las MAPK, la activación de Ras lleva a la activación de PI3K (fosfoinositol-3 cinasa), que activa la serina-treonina cinasa AKT que también promueve la supervivencia y la entrada al ciclo celular. AKT puede fosforilar a la proteína pro apoptótica Bad, con lo que impide su asociación con Bcl2. Por otro lado, inhibe la apoptosis porque bloquea la unión de la proteína antiapoptótica Bcl-xl (que se ha encontrado elevada en todos los estadios de maduración megacariocítica) con la caspasa-3.<sup>43</sup> Además, es capaz de fosforilar a Forkhead, con lo que impide su translocación al núcleo y que Forkhead active la transcripción de genes pro apoptóticos como Fas y p27.<sup>25</sup> Todas estas vías estimuladas por la presencia de TPO en su receptor culminan en inhibición de la apoptosis y aumento en la proliferación de megacariocitos.

De igual forma, también es importante conocer la regulación negativa de las vías de señalización activadas por TPO. Las proteínas fosfatasa desempeñan un papel fundamental en la regulación de estas vías, por ejemplo, se han hecho modelos murinos de deficiencia de SHP1, llamados *motheaten*, en los cuales se ha encontrado un aumento en la

proliferación e hipersensibilidad a los factores de crecimiento en general, aunque no hay informes de lo que sucede en la megacariopoyesis.<sup>44</sup> Otro regulador negativo es la familia de supresores de señalización de citocinas o SOCS, inducidos por STAT y, por lo tanto, regulan negativamente la vía JAK/STAT. Por un lado se pueden unir a la JAK inhibiendo su función de cinasa, además pueden unirse a las STAT impidiendo su dimerización o incluso inhibiendo su unión al ADN. En un estudio realizado por Wang en 2000 se encontró que el IFN $\alpha$  induce SOCS-1, la cual inhibe la megacariopoyesis a través de la inhibición de la fosforilación STAT3 inducida por TPO.

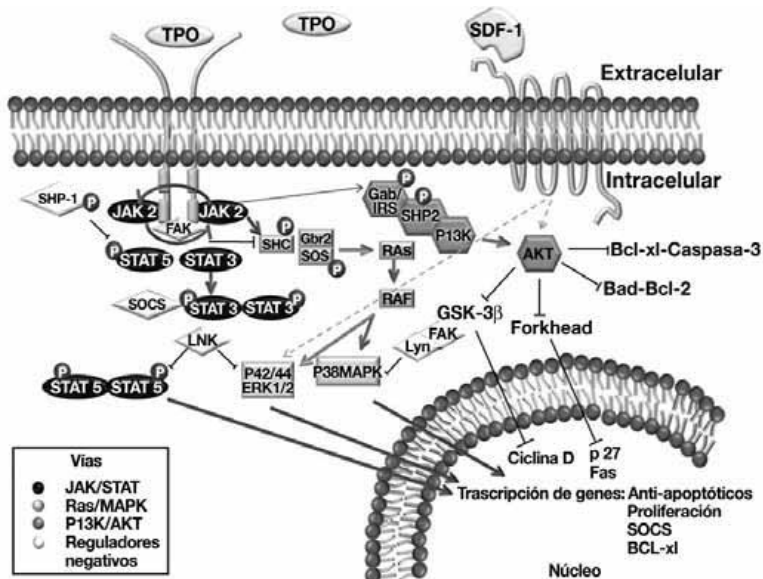
La proteína adaptadora Lnk implicada en receptores de citocinas y señalización de inmunorreceptores, tiene un efecto negativo en la proliferación y endomitosis inducida por TPO. Lnk disminuye la progresión a fase S inducida por TPO, disminuye el crecimiento de megacariocitos de médula ósea en cultivo. Además, los ratones deficientes en Lnk tienen un aumento en el número de megacariocitos tanto en médula ósea como en bazo debido a hipersensibilidad a TPO.<sup>45</sup> La activación de MAPK y STAT5 inducida por TPO está disminuida ante la unión del megacariocito con VCAM1 de células endoteliales, y este proceso es mediado por Lnk, por lo que esta inhibición podría regular negativamente la liberación de plaquetas a la circulación.<sup>46</sup>

Por otro lado, de igual manera se ha estudiado la activación de Lyn, una proteína de la familia Src cinasas estimulada por TPO, la cual en apariencia regula negativamente la proliferación inducida por TPO disminuyendo la duración y la intensidad de la actividad de las MAPK.<sup>47</sup> Las cinasas de adhesión focal son tirosincinasas no receptoras que se activan sobre todo cuando hay unión con integrinas. Las cinasas de adhesión focal regulan negativamente la megacariopoye-

sis inducida por TPO y es posible que interactúen con Mpl porque tienen un dominio FERM que pueden usar para unirse a este receptor. Las cinasas de adhesión focal también pueden interactuar con Lyn, así que su regulación negativa pudiera estar relacionada con esta proteína<sup>48</sup> (Figura 3).

La ausencia de TPO o mutaciones en el receptor Mpl en niños se manifiesta con trombocitopenia y disminución de las células troncales hematopoyéticas y células progenitoras de todos los linajes hematopoyéticos. La trombocitopenia amegacariocítica congénita es una rara enfermedad ocasionada por mutaciones en Mpl, en la cual el paciente se encuentra en riesgo de desarrollar una anemia aplásica por el papel de la TPO sobre las células troncales hematopoyéticas.<sup>49-51</sup> Es notorio que los ratones TPO<sup>-/-</sup> y Mpl<sup>-/-</sup> tengan una hematopoyesis normal, quizá porque la cinética de las células troncales hematopoyéticas de ratón es diferente que la de las células troncales hematopoyéticas de humano.<sup>3</sup>

Existen mutaciones activantes en el promotor del gen de TPO y Mpl (c-Mpl Baltimore) que resultan en un tipo de trombocitemia esencial familiar, una enfermedad en la cual existe megacariocitosis y trombocitosis que suele estar acompañada de hiperagregabilidad plaquetaria.<sup>52,53</sup> La trombocitemia esencial adquirida se ha relacionado más bien con mutaciones en JAK2, específicamente un cambio de una valina por una fenilalanina en la posición 617 (JAK2V617F) y estas diferencias en el mecanismo de producción de la enfermedad hacen que la forma familiar tenga un mejor pronóstico que la adquirida, en la que el riesgo de transformación leucémica es mayor. Aún se desconoce por qué la mutación de JAK2 puede dar lugar a policitemia vera en algunos casos y a trombocitemia esencial en otros.<sup>42,54</sup>



**Figura 3.** Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis, con énfasis en la TPO. La tirosinasa JAK2 inicia la fosforilación del receptor Mpl y de proteínas importantes como STAT. Además, activa la vía de Ras y MAPK, así como PI3K y AKT. La quimiocina SDF1 a través de su receptor CXCR4 activa p42/44 MAPK y AKT, sinergizando la acción de la TPO. Se ilustran también algunos puntos de regulación negativa explicados en el texto.

La TPO continúa siendo objeto de investigación como un agente trombopoyético o hematopoyético que pudiera aplicarse en la clínica y también como un agente que estimula la expansión *ex vivo* de las células troncales hematopoyéticas.<sup>55</sup> Por otro lado, la investigación actual apunta a descubrir otras citocinas y quimiocinas que pueden estimular la megacariopoyesis de manera independiente a la TPO y que se comentan a continuación.

### *Megacariopoyesis independiente de TPO*

Además de TPO, son importantes la IL3, IL6 e IL11 y recientemente ha crecido la importancia del factor-1 derivado del estroma (SDF1 o CXCL12) y el factor de crecimiento fibroblástico-4 (FGF4 o CXCL4) en la megacariopoyesis y liberación plaquetaria, como se discute a continuación.

### *SDF1/FGF4*

Los megacariocitos en cultivo son capaces de liberar pro plaquetas incluso sin contacto directo con células del estroma, sin embargo, liberan menos plaquetas que *in vivo*. Estudios recientes han demostrado que las quimiocinas SDF1 que actúan a través de su receptor CXCR4 y FGF-4 son capaces de restablecer la trombopoyesis en ratones TPO<sup>-/-</sup> y Mpl<sup>-/-</sup>, debido a que guían a los progenitores megacariocíticos del “nicho osteoblástico” al “nicho vascular”, mediante la molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM1) y el antígeno muy tardío 4 (VLA4), promoviendo la supervivencia, maduración y liberación plaquetaria.<sup>56</sup>

Esto pone de manifiesto la gran importancia del microambiente creado por las células del estroma para facilitar este proceso. De hecho, al interferir experimentalmente con la motilidad del megacariocito o al alterar el nicho vascular se inhibe la trombopoyesis en condiciones fisiológicas y después de mielosupresión. Es interesante también mencionar que FGF4 y SDF1 disminuyen la trombocitopenia debida a mielosupresión, por lo que estos datos sugieren que mientras la TPO es indispensable para la expansión de células progenitoras, las quimiocinas son importantes para que estas progenitoras se localicen en el nicho vascular en un microambiente adecuado para su maduración y liberación plaquetaria.<sup>57-59</sup>

FGF4 tiene actividad de tirosinasa intrínseca y aumenta tanto el número como el tamaño de los megacariocitos y el número de plaquetas circulantes aparentemente porque aumenta la adhesión de los progenitores megacariocíticos a las células endoteliales de médula ósea y actúa en conjunto con SDF1, como se demostró utilizando un adenovirus recombinante que expresaba FGF4.

SDF1 es miembro de la familia CXC de quimiocinas que se une a CXCR4 y activa las vías de PI3K y MAPK, MAPK p42/44 y p38, con lo que aumenta la supervivencia y proliferación de los megacariocitos, además de ser quimiotáctico para que los megacariocitos se adhieran a las células endoteliales de médula ósea y favorecer la liberación plaquetaria.<sup>60</sup>

Una posible aplicación de SDF1, aparte del tratamiento en la mielosupresión, es en la trombocitopenia secundaria a infección por VIH, ya que este virus infecta a los megacario-

citosis a través de la interacción con el receptor CXCR4, así que fármacos análogos de SDF1 podrían competir con el virus y mejorar la trombocitopenia relacionada con esta enfermedad.<sup>61</sup>

## **Señalización por receptores Gp130**

Algunas citocinas de la familia de la IL6 que utilizan vías de señalización dependientes de la glucoproteína 130 (Gp130), como la IL11 y LIF, promueven la maduración y proliferación de megacariocitos *in vitro* y aumentan los efectos de IL3 y TPO, como se comentó. Estas citocinas participan en las modificaciones del citoesqueleto de los megacariocitos que preceden a la liberación de plaquetas. Incluso la IL6 ha demostrado aumentar la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por varios agonistas además de que aumenta la cuenta plaquetaria.<sup>62</sup> La IL11 recombinante (Neumega) es el único medicamento aprobado para tratar la trombocitopenia en pacientes sometidos a quimioterapia<sup>63,64</sup> (Orazi y colaboradores, 1996).

La Gp130 es una glucoproteína de 130 kD anclada en la membrana que sirve como subunidad receptora y activa la vía JAK/STAT y la vía Ras/Raf/MAPK. Se activa la proteína JAK1 fundamentalmente, pero también se ha visto que JAK2 y TyK2 pueden activarse y posteriormente éstas fosforilan STAT1/STAT3 y SHP2. Los ratones Gp130<sup>-/-</sup> presentan trombocitopenia moderada, aunque no hay reducción en el número de progenitores de megacariocitos, por lo que estas citocinas deben tener un papel importante, sobre todo en la maduración de los megacariocitos, más que en la proliferación de sus precursores.<sup>60</sup>

## **Señalización NOTCH**

Notch y sus ligandos son proteínas transmembranales de las que se conocen cuatro tipos (1-4) y sus respectivos ligandos (Jagged1, 2 y Delta-like 1, 3, 4), los cuales están presentes en todos los mamíferos. Las proteínas N1, N3, N4, Jagged1 y Delta-like 1 están presentes en los megacariocitos.

Esta vía de señalización promueve la megacariopoyesis sobre la eritropoyesis. De hecho, la presencia de ligandos Notch en el microambiente de la médula ósea inhibe la diferenciación celular hacia el linaje eritroide, esto mediado en parte por inhibición de JNK. Además, se ha demostrado que también regula la decisión de las células precursoras de diferenciarse a linaje eritroide/megacariocítico porque suprime a GATA1.<sup>60</sup>

## **BMP4**

La familia de TGFβ, incluyendo activinas y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), regula muchos eventos celulares como proliferación, diferenciación, migración y desempeña un papel importante en la hematopoyesis. La BMP4 es fundamentalmente generada por las células del estroma de la médula ósea y puede ser producida también por progenio-

tores megacariocíticos; en estudios *in vitro* ha demostrado regular todas las etapas de la megacariopoyesis, aparentemente a través de las mismas vías de señalización que induce TPO. Se ha propuesto que se estudie como posibilidad terapéutica en la trombocitopenia.<sup>65</sup>

## NMDA

Genever y colaboradores, en 1999, demostraron que existen receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) para glutamato en megacariocitos. Estos receptores se utilizan en la neurotransmisión sináptica en el sistema nervioso central, pero se han visto involucrados en la diferenciación de células megacarioblásticas y, más aún, el bloqueo de estos receptores provocó inhibición en el aumento del tamaño y disminución de la expresión de CD41 en megacariocitos.<sup>66</sup>

Los NMDA son receptores para glutamato y existen subtipos: NR1, NR2 (A, B, C o D) y NR3 (A y B). Los megacariocitos expresan los subtipos NR1 y NR2 y se ha visto que ante glutamato y glicina, NR1 y NR2D forman un heterodímero que abre canales de calcio, con lo que aumenta el calcio intracelular, el cual forma complejo con calmodulina y con ello se activan cinasas dependientes de este complejo, como la proteincinasa C (PKC) y la tirosincinasa Src. La PKC estimula la diferenciación vía PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetato) y Src activa la vía de Ras/MAPK. Todas estas vías de señalización estimulan la maduración, proliferación, formación de plaquetas, adhesión y agregación. De hecho, el empleo de inhibidores farmacológicos provoca un arresto en la maduración *in vitro*. En ratones  $Mpl^{-/-}$  no está afectado el receptor NR1, lo que apunta a que es totalmente independiente de la señalización por TPO.<sup>66-68</sup>

## Perspectivas

Como se mencionó previamente, el descubrimiento de TPO y su receptor permitió que se pudieran hacer cultivos de megacariocitos y que nuestro conocimiento sobre la megacariopoyesis se incrementara en forma exponencial en los últimos años. Los recientes avances en los mecanismos moleculares que regulan la megacariopoyesis, tanto dependientes de TPO como independientes de ella, nos permiten comprender gran parte del proceso, pero aún tenemos algunas preguntas por responder respecto a los megacariocitos. Un ejemplo de estas preguntas es conocer la razón por la que son células poliploides, ¿es únicamente por qué requieren gran cantidad de citoplasma para crear miles de plaquetas? En cuanto a las vías de señalización, cada vez sabemos más y se encuentran puntos de interacción entre las diferentes vías involucradas. Aún falta investigar sobre los mecanismos de acción de las proteínas que regulan positiva o negativamente la megacariopoyesis, como Lyn, cinasas de adhesión focal, BMP4, etcétera. Cobra cada vez más relevancia la interacción de los megacariocitos con las células del estroma y las células endoteliales como mecanismos de regulación de la formación de plaquetas. A pesar del

gran avance en este tema, falta mucho por investigar y en los próximos años comprender con mayor profundidad los mecanismos moleculares que regulan la megacariopoyesis, para poder incidir terapéuticamente en los pacientes con afecciones en el número o calidad de las plaquetas.

No podemos dejar de lado la importancia que el ambiente tiene como un factor predisponente o desencadenante de diversas alteraciones, en este caso las que afectan la producción o funcionalidad de las plaquetas y su progenitor. Rara vez, al menos en el campo de la hematología, el médico recuerda que en la atmósfera que su paciente inhala puede estar el origen de la patología que observa en su paciente. Hay que estudiar con más cuidado esta relación ambiente-salud, ya que cada vez más se asocia el aumento en los contaminantes ambientales con la mayor incidencia de enfermedades trombohemorrágicas. En nuestro grupo de investigación estamos determinando el efecto del vanadio en las vías de señalización del megacariocito y sus consecuencias en la función plaquetaria, y pensamos continuar el estudio en este campo analizando el efecto de otros contaminantes ambientales.

## Agradecimientos

Al doctor Héctor Mayani Viveros, por su colaboración en la revisión del manuscrito. A Patricia Bizarro Nevares, Francisco Pasos-Nájera y Adrián Rondán-Zarate, por su asistencia técnica en microscopía. La primera autora es estudiante de doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Este trabajo es parte de un proyecto apoyado parcialmente por PAPIIT-DGAPA, UNAM IN210409.

## Referencias

1. Fortoul TI, Rojas-Lemus M. Vanadium as an air pollutant En: Vanadium: Its impact on health. New York: Nova Science Pub; 2007. pp. 1-6.
2. González-Villalva A, Ávila-Costa MR, Piñón-Zárate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, et al. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inhalation. Toxicol Industrial Health 2006;22:113-116.
3. Díaz-Bech P, Piñón-Zárate G, Díaz-Bech ME, Fortoul TI. The hematopoietic system and vanadium toxicity. En: Vanadium: Its impact on health. New York: Nova Science Pub; 2007. pp. 43-50.
4. Fortoul TI, Piñón-Zárate G, Díaz-Bech ME, González-Villalva A, Mussali-Galante P, Rodríguez-Lara V, et al. Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. Histol Histopathol 2008;23:1321-1326.
5. Fortoul TI, González-Villalva A, Piñón-Zárate P, Rodríguez-Lara V, Montañón LF, Saldívar L. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in Spleen and bone marrow. J Electron Microscopy 2004;114:447-453.
6. González-Villalva A, Rodríguez-Lara V, Montañón LF, Lima-Melo A, Ramírez G, Fortoul TI. Blood changes generated after vanadium inhalation. Current Trends in Toxicology 2010.
7. Gupta GP, Massagué J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. J Clin Invest 2004;114:1691-1693.
8. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J Clin Invest 2005;115:3339-3347.
9. Andrews R, Berndt M. Platelet physiology and thrombosis. Thrombosis Res 2004;114:447-453.
10. Thawlow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn P.F. Blood platelet count and function related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. Circulation 1991;84:613-617.
11. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. Blood 1998;91:4397-418.
12. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: New ultrastructural evidence for an old concept. Am J Pathol 2000;157:69-74.
13. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoiesis. Cancerología 2007;2:95-107.

14. **Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al.** Identification of Flt3+ lympho-mieloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005;121:295-306.
15. **Mc Donald T, Sullivan P.** Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. *Exp Hematol* 1993;21:1316-1320.
16. **Hunt P.** A bipotential megakaryocyte/erythrocyte progenitor cell: the link between erythropoiesis and megakaryopoiesis becomes stronger. *J Lab Clin Med* 1995;125:303-304.
17. **Debili N, Coulombel L, Croisille L.** Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 1996;88:1284-1296.
18. **Tomer A.** Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* 2004;104:2722-2727.
19. **Italiano JE, Hartwig JH.** Megakaryocyte development and platelet formation. En: Michelson AD, editor. *Platelets*. Second edition. Canada: Academic Press; 2007. pp. 23-44.
20. **De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, et al.** Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100:1310-1317.
21. **Radley JM, Scurfield G.** The mechanism of platelet release. *Blood* 1980;56:996-999.
22. **Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P.** Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85:402-413.
23. **Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH.** Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147:1299-1312.
24. **Geddis AE, Kaushansky K.** The root of platelet production. *Science* 2007;317(5845):1689-1691.
25. **Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K.** Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2002;13:61-73.
26. **Marcucci R, Romano M.** Thrombopoietin and its splicing variants: structure and functions in thrombopoiesis and beyond. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:427-432.
27. **Wendling F, Varlet P, Charon M, Tambourin P.** A retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemia disorder in mice. *Virology* 1986;149:242-246.
28. **Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht.** Molecular cloning and characterization of MPL the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5640-5644.
29. **Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, et al.** Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369: 568-571.
30. **Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F.** Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor c-Mpl. *Cell* 1994;77:1117-1124.
31. **Zhou W, Toombs CF, Zou T, Guo J, Robinson MO.** Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood* 1997;89:1551-1559.
32. **Kuter DJ.** Thrombopoietin: biology and clinical applications. *Oncologist* 1996;1:98-106.
33. **Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, Miyazaki H, Handa M, Ohashi H, Ikeda Y.** Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood* 1996;87:439-446.
34. **Kuter DJ, Rosenberg RD.** The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85:2720-2730.
35. **Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser W, Offner FA, Zoller H, et al.** Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001;98:2720-2725.
36. **Drachman J, Sabath D, Fox N, Kaushansky K.** Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood* 1997;89:483-492.
37. **Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K.** The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of JAK2, Shc and c-Mpl. *J Biol Chem* 1995;270:4979-82.
38. **Kirito K, Fox N, Kaushansky K.** Thrombopoietin stimulates expression of HoxB4: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;102:3172-3178.
39. **Kirito K, Fox N, Kaushansky K.** Thrombopoietin induces the nuclear translocation of HoxA9 in hematopoietic stem cells (HSC): a potential explanation for the favorable effects of TPO on HSCs. *Mol Cell Biol* 2004;24:6751-6762.
40. **Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K.** Thrombopoietin induced activation of the mitogen activated protein kinase pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 1999;94:1273-1282.
41. **Van Willigen G, Gorter G, Akkerman JW.** Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2 cPLA2 pathway. *Thromb Haemost* 2000;83:610-616.
42. **Kaushansky K.** On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005;105:4187-4190.
43. **Kozuma Y, Kojimas H, Yuki S, Suzuki H, Nagasawa T.** Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J Thromb Haemost* 2007;5:1274-1282.
44. **Rawlings J, Rosler K, Harrison D.** The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Science* 2004;117:1281-183.
45. **Tong W, Lodish H.** Lnk Inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 2004;5:569-580.
46. **Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S.** Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Experimental Hematol* 2008;36:897-906.
47. **Lanutti B, Drachman J.** Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood* 2004;103:3736-3743.
48. **Hitchcock I, Fox N, Pre'vost N, Sear K, Shattil S, Kaushansky K.** Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage-specific FAK knockout. *Blood* 2008;111:596-604.
49. **Ihara K, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good R, Hara T.** Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3132-136.
50. **Van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman C, Peters M, Faulkner LB, de Haas M, von dem Borne AE KR.** Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2000;110:441-448.
51. **Ballmaier M, Germeshausen M, Krukemeier S, Welte K.** Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:17-25.
52. **Ghilardi N, Skoda RC.** A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. *Blood* 1999;94:1480-82.
53. **Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranish Mi, Ito M, Satoh A, et al.** Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004;103:4198-4200.
54. **Barbui T.** The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy or a combination of both? *Semin Hematol* 2004;41:15-17.
55. **Basser R.** The impact of thrombopoietin on clinical practice. *Curr Pharm Des* 2002;8:369-377.
56. **Majka M, Janowska-Wiezoarek A, Ratajczak J, Kowalska A, Vilarie G, Pan ZK, et al.** Stromal-derived factor-1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000;96:4142-4151.
57. **Avecilla ST, Hattoori H, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al.** Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10:64-71.
58. **Slayton WB, Wainman DA, Li XM, Hu Z, Jotwani A, Cogle CR, et al.** Developmental differences in megakaryocyte maturation are determined by the microenvironment. *Stem Cells* 2005;23:1400-1408.
59. **Sun Li, Ying Khee Hwang W, Eng Aw S.** Biological characteristics of megakaryocytes: Specific lineage commitment and associated disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1821-1826.
60. **Zheng C, Yang R, Han Z, Zhou B, Liang L, Lu M.** TPO-Independent Megakaryocytopoiesis. *Crit Rev Onco Hematol* 2008;65:212-222.
61. **Lee B, Ratajczak J, Doms RW, Gerwitz AM, Ratajczak MZ.** Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: biological implications for human immunodeficiency virus-type 1 infection. *Blood* 1999;93:1145-1156.
62. **Deutsch VR, Tomer A.** Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006;134:453-466.
63. **Pang L, Weiss MJ, Poncz M.** Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest* 2005;115:3332-3338.
64. **Orazi A, Cooper RJ, Tong J, Gordon MS, Battiato L, Sledge GW Jr, et al.** Effects of recombinant human interleukin-23 (Neumega rIL-11 growth factor) on megakaryopoiesis in human bone marrow. *Exp Hematol* 1996;24:1289-1297.
65. **Jeanpierre S, Nicolini FE, Kaniewski B, Dumontet B, Rimokh R, Puisieux A, et al.** BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood* 2008;112:3154-63.
66. **Genever P, Wilkinson D, Patton A, Peet M, Hong Y, Mathur A, et al.** Expression of a Functional N-Methyl-D-Aspartate-Type Glutamate Receptor by Bone Marrow Megakaryocytes. *Blood* 1999;93:2876-2883.
67. **Hitchcock IS, Skerry TM, Howard MR, Genever PG.** NMDA receptor-mediated regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood* 2003;102(4):1254-1259.
68. **Skerry TM, Genever PG.** Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:174-81.