

TROMBOXANO B₂ Y FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS EN LA TROMBOCITEMIA ESENCIAL TRATADA CON ANAGRELIDE

MARIA SUSANA LAGUNA*, LAURA I. KORNBLIHTT, ROSANA F. MARTA, FELISA C. MOLINAS**

Sección Hematología-Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen Presentamos los resultados obtenidos en 17 pacientes con trombocitemia esencial antes del tratamiento con anagrelide y durante la remisión hematológica y clínica inducida por esta droga. Diez pacientes tenían manifestaciones clínicas relacionadas con la trombocitemia, en 8 de ellos al momento de iniciar el tratamiento. Se midieron los niveles plasmáticos del TXB₂ y del PDGF por técnica de ELISA. Antes del tratamiento los valores plasmáticos del PDGF corregidos por el recuento de plaquetas eran significativamente menores que en los controles ($p = 0.02$), y no difirieron de los resultados obtenidos durante la remisión. En cambio, los valores plasmáticos del TXB₂, corregidos de acuerdo al recuento de plaquetas, estaban más elevados que en los controles ($p = 0.04$), y disminuyeron significativamente durante la remisión ($p = 0.04$), aunque todavía estaban por sobre los valores normales ($p = 0.008$). Los síntomas desaparecieron en todos los pacientes cuando el recuento de plaquetas se normalizó. Estos resultados muestran que los pacientes con trombocitemia esencial tratados con anagrelide y en remisión hematológica y clínica tienen tendencia a normalizar los niveles del TXB₂.

Abstract *Thromboxane B₂ and platelet derived growth factor in essential thrombocythemia under anagrelide treatment.* We present herein studies carried out in 17 patients with essential thrombocythemia before treatment with anagrelide and on remission. Ten patients had symptoms related to thrombocythemia, 8 of them at the time of starting treatment. The plasmatic levels of TXB₂ and PDGF were measured by ELISA technique. Before treatment, PDGF values corrected for the platelet count were lower than controls, 0.48 ng/10⁵ platelets (0.13-1.93) and 0.92 ng/10⁵ platelets (0.33-1.16) respectively ($p = 0.02$), and they were not different from the results obtained during remission. Count-corrected TXB₂ levels before treatment were higher than the control group, 1.0 ng/10⁵ platelets (0.04-14.4) and 0.25 ng/10⁵ platelets (0.13-0.39) respectively ($p = 0.04$); these values decreased during remission 0.86 ng/10⁵ platelets (0.07-9.8) ($p = 0.04$), although they were still above normal values ($p = 0.008$). Symptoms disappeared with the normalization of platelet counts in all cases. These results show that patients with essential thrombocythemia during remission have a tendency to normalize the count-corrected TXB₂ values.

Key words: TXB₂, PDGF, essential thrombocythemia, anagrelide

Los pacientes con síndromes mieloproliferativos, entre ellos la trombocitemia esencial (TE), presentan con frecuencia alteraciones de la función plaquetaria^{1,2}. Estas alteraciones consisten en agregación plaquetaria anormal en respuesta a agonistas tales como la adrenalina, el ADP y el colágeno, así como también la agregación espontánea y la activación *in vivo*, evidenciada por el aumento de los niveles plasmáticos del factor plaquetario 4 (FP4), beta tromboglobulina (β -TG)³, factor plaquetario derivado de plaquetas (PDGF)⁴ y el aumento en orina

del tromboxano B₂ (TXB₂)⁵. Se buscó la existencia de una relación entre estos hallazgos de laboratorio y el cuadro clínico, pero los resultados aún no son claros. Queda por establecer si los mecanismos que conducen a la activación plaquetaria están relacionados con las alteraciones plaquetarias, considerando que la TE es de origen clonal en alrededor del 40% de los casos^{6,7}, o si son secundarias a factores exógenos como el daño endotelial. Sin embargo, Bellucci y col.⁸ no hallaron aumento en el plasma de los marcadores de daño endotelial (trombomodulina, proteína S, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), activador del plasminógeno tisular (t-PA) y factor von Willebrand en 16 pacientes con TE estudiados, pero hay que tener en cuenta que éstos estaban en el momento del estudio bajo tratamiento con hidroxiurea y/o con inhibidores de la función plaquetaria. Por otra parte, van Gederen y col.⁹ propusieron que el aumento de los niveles de trombomodulina en sus pa-

Recibido: 7-III-2000

Aceptado: 28-VI-2000

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

** Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET

Dirección postal: Dra. Felisa C. Molinas, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4523-8947 e-mail: fmolinas@mail.retina.ar

cientes podría ser secundario al aumento del número de plaquetas, pero no siempre se consiguió la reversión de las alteraciones plaquetarias en TE después de la normalización del número de plaquetas por el tratamiento. La normalización transitoria de la respuesta a la agregación plaquetaria inducida por adrenalina y el ADP fue descrita por Orlin y col.¹⁰ después de la plaquetoferesis y por Inceman y col.¹¹ durante la remisión de la enfermedad por quimioterapia. En cambio, otros autores no hallaron cambios de la función plaquetaria durante la remisión por el tratamiento con anagrelide en pacientes con TE^{12, 13}.

El anagrelide, una imidazoquinazolina, que se usó inicialmente como agente antiagregante¹⁴, tiene un efecto trombocitopénico reversible¹⁵. Las dosis utilizadas para disminuir el número de plaquetas en pacientes con trombocitemia asociada a síndromes mieloproliferativos no afectan la función plaquetaria, la sobrevivencia plaquetaria ni el número de megacariocitos¹⁶. En cambio, produce disminución del tamaño y otros cambios morfométricos en esta célula, sugiriendo que el anagrelide disminuye el número de plaquetas por interferencia con la maduración megacariocítica^{15, 16}. Silverstein y col.¹⁷ fueron los primeros en demostrar la efectividad del anagrelide para controlar la trombocitosis asociada con el SMP crónico.

Con el objeto de evaluar la influencia del aumento del número de plaquetas sobre los niveles plasmáticos de TXB₂ y del PDGF, se hicieron estos estudios en pacientes con TE antes y durante el tratamiento con anagrelide, cuando tenían plaquetas normales y estaban en remisión clínica.

Materiales y métodos

Pacientes y controles normales: Se incluyeron en el estudio 17 pacientes consecutivos con diagnóstico de trombocitemia esencial de acuerdo a los criterios del Grupo de Estudio de la Policitemia Vera^{18, 19}. La edad mediana al diagnóstico era de 34 años (rango 21-68), 12 eran mujeres. Los estudios se realizaron entre 3 meses y 8 años después del diagnóstico de TE, antes del tratamiento con anagrelide y durante la remisión clínica y hematológica de la enfermedad, con un seguimiento entre 2 y 6 años. Las características clínicas de estos pacientes aparecen en otra publicación²⁰ y se resumen en la Tabla 1. Síntomas relacionados con la trombocitemia presentaron 10 pacientes, en 8 casos estaban presentes al momento de iniciar el tratamiento y consistieron en: equimosis, gingivorragias, eritromelalgia, acroparestesia, accidente isquémico transitorio (AIT), y una paciente tuvo episodios sucesivos de trombosis y hemorragias entre 4 y 8 años antes del estudio. Como controles se estudiaron 12 sujetos normales (personal de laboratorio) que tenían una edad mediana de 43 años (25-60), 6 eran mujeres. La dosis inicial de anagrelide osciló entre 4.0 y 3.0 mg/día, con reducción progresiva hasta lograr una dosis de mantenimiento entre 1.0 y 2.5 mg/día. Se debe tener en cuenta que no hay una dosis estándar, sino que se debe evaluar en cada caso la dosis mínima necesaria para mantener las cifras de plaquetas dentro de límites normales. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Institucional (IDIM A. Lanari) y los pacientes firmaron el consentimiento informado.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena antecubital con el sistema de la doble jeringa. Tanto los controles normales como los pacientes no habían tomado aspirina ni ninguna otra medicación que altere la fun-

TABLA 1.— Manifestaciones clínicas en los pacientes con trombocitemia esencial relacionadas con los niveles de TXB₂ y PDGF corregidos por el número de plaquetas

Paciente	Edad	Síntomas	TXB ₂		PDGF	
			NT	T	NT	T
1	47	Acroparestesia/gingivorragia	0.27	0.15	0.69	0.44
2	34	Acroparestesia	3.60	1.15	0.66	0.74
3	32		2.98	0.88	0.22	0.73
4	67	AIT ¹	1.01	1.54	0.45	0.86
5	34		0.68	0.86	0.24	0.94
6	68		0.04	1.32	0.48	0.87
7	30		6.84	1.36	0.45	0.42
8	29	Gingivorragia/equimosis	0.97	0.09	0.89	0.45
9	21	Eritromelalgia	0.06	0.22	0.76	0.47
10	55		0.21	0.54	0.13	0.68
11	44	Trombosis ¹ (portal, mesentérica, esplénica)/gingivorragia	14.42	9.8	0.56	0.62
12	44	Gingivorragia	0.09	0.11	0.82	0.48
13	34	Metrorragia	1.76	0.75	0.21	0.46
14	24	Eritromelalgia	4.29	0.98	0.26	0.60
15	28		2.51	0.07	0.27	0.07
16	67		0.07	2.06	1.08	0.99
17	35	AIT	3.21	0.41	1.93	0.56
Rango normal			0.13-0.39		0.33-1.16	

¹Estos episodios ocurrieron 3-4 años antes del estudio. NT: no tratados; T: tratados con anagrelide; AIT, accidente isquémico transitorio; N: negativo; P: positivo.

ción plaquetaria en los 10 días anteriores. Las muestras se anticoagularon con citrato trisódico 129 nM (9:1, v/v). El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo de la siguiente manera: primero el plasma rico en plaquetas (PRP) se preparó por centrifugación de la muestra de sangre a 180 g durante 10 min, luego se separaron los dos tercios superiores de la columna de PRP y el PPP se obtuvo por dos centrifugaciones sucesivas de la muestra remanente, la primera a 1 800 g durante 20 min y la segunda a 12 000 g por 3 min en una microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Alemania), y se mantuvo a -70°C . Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente.

Niveles plasmáticos de PDGF y de TXB_2

Los niveles de PDGF y TXB_2 se determinaron en el PPP usando una técnica de enzimoimmunoensayo (Quantikine immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA y Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, respectivamente). En tres pacientes las determinaciones se efectuaron en varias oportunidades en muestras diferentes.

Análisis estadístico

Los valores se expresaron en mediana y rango. Se usó el test Mann-Whitney para comparar los datos de los controles normales y pacientes. El test de rangos señalados de Wilcoxon se empleó para comparar datos continuos antes del tratamiento y durante la remisión²¹. El significado estadístico se definió como $p < 0.05$.

Resultados

Las características clínicas, los recuentos de plaquetas, los niveles de PDGF y del TXB_2 corregido por el número de plaquetas de 17 pacientes con TE aparecen en la Tabla 1. Los recuentos de plaquetas antes del tratamiento y en la remisión fueron respectivamente ($\times 1\,000/\mu\text{l}$), 980 (610-2 030) y 378 (212-546).

Niveles plasmáticos de PDGF y TXB_2

Los niveles de PDGF en los controles normales fue de 2.77 ng/ml (0.99-4.66) y en los pacientes antes del tratamiento 4.8 ng/ml (1.9-14.5), $p = 0.005$; en 12 casos (70%) los valores estuvieron por sobre el rango normal. Durante la remisión de la enfermedad estos valores volvieron a lo normal, 2.13 ng/ml (0.41-3.50), $p = 0.003$, aunque en un caso la cifra se mantenía aún alta. Los valores de TXB_2 en los controles era de 0.63 ng/ml (0.34-0.97) y en los pacientes antes del tratamiento 13.8 ng/ml (0.52-92), $p = 0.0002$. No obstante, niveles superiores a 1.0 ng/ml se observaron en 13 casos (76%). Los valores de TXB_2 durante la remisión fueron menores que antes del tratamiento, 3.2 ng/ml (0.37-37.0), $p = 0.004$, pero eran aún superiores a los valores normales, $p = 0.004$. No se halló ninguna correlación entre los valores de PDGF y TXB_2 ni entre éstos y los recuentos de plaquetas. Los niveles de PDGF y TXB_2 evaluados

en varias ocasiones en tres pacientes mostraron variaciones mínimas entre las determinaciones.

Corrección de los niveles de PDGF y TXB_2 por el recuento de plaquetas

Los niveles de PDGF y TXB_2 se analizaron después de corregir los valores por el recuento de plaquetas. Los valores de PDGF corregidos eran menores en los pacientes que en los controles, 0.48 ng/ 10^5 plaquetas (0.13-1.93) y 0.92 ng/ 10^5 plaquetas (0.33-1.16) respectivamente, $p = 0.02$ (Fig. 1). Los niveles de PDGF corregidos por el recuento de plaquetas durante el tratamiento eran 0.60 ng/ 10^5 plaquetas (0.07-0.99), que no diferían de los obtenidos antes del tratamiento. Los valores de TXB_2 corregidos por el número de plaquetas obtenidos antes del tratamiento eran más elevados que en el grupo control, 1.0 ng/ 10^5 plaquetas (0.04-14.4) y 0.25 ng/ 10^5 plaquetas (0.13-0.39) respectivamente, $p = 0.04$ (Fig. 2). Durante la remisión los valores corregidos de TXB_2 disminuyeron, 0.86 ng/ 10^5 plaquetas (0.07-9.8), $p = 0.04$, pero estaban aún por encima de lo normal $p = 0.008$. No se halló ninguna correlación entre los valores corregidos del TXB_2 y la edad o los eventos trombóticos. La paciente que tenía niveles elevados de TXB_2 y la edad o los eventos trombóticos. La paciente que tenía niveles elevados de TXB_2 corregidos por las plaquetas antes del tratamiento y durante la remisión (15.59 ng/ 10^5 plaquetas y 9.8 ng/ 10^5 plaquetas) y persistencia de la agregación plaquetaria espontánea, había presentado trombosis portal, mesentérica y esplénica.

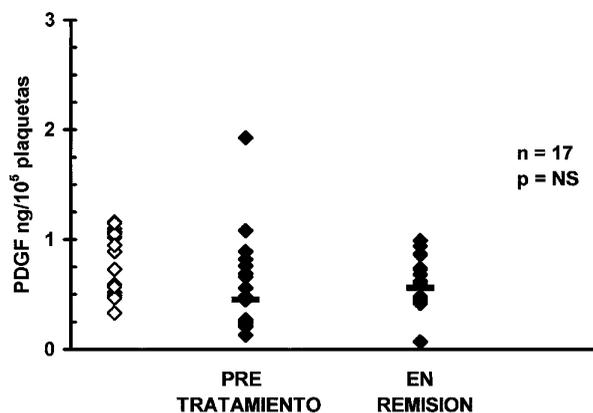


Fig. 1.— Niveles plasmáticos de PDGF corregidos por el recuento de plaquetas en pacientes con trombocitemia esencial antes y durante el tratamiento con anagrelide. Los valores pre tratamiento son significativamente diferentes del rango normal, $p = 0.02$. Los rombos abiertos representan los valores normales.

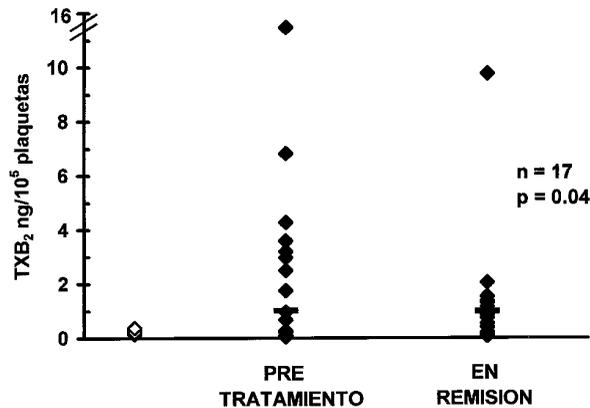


Fig. 2.— Valores de TXB₂ corregidos por el recuento de plaquetas en trombocitemia esencial antes y durante el tratamiento con anagrelide. Los rombos abiertos representan los valores normales.

Discusión

En este estudio de 17 pacientes con diagnóstico de TE se hallaron aumento de los niveles plasmáticos de TXB₂ y PDGF. Estos resultados sugieren la existencia de plaquetas que podrían estar activadas *in vivo* y/o de plaquetas susceptibles de activarse *ex vivo* en las condiciones estándar de su preparación. Al inicio del tratamiento con anagrelide, 4 pacientes estaban con síntomas de oclusión vascular (eritromelalgia y acroparestesia) y 5 tenían manifestaciones hemorrágicas leves. Las manifestaciones clínicas desaparecieron y las alteraciones de laboratorio tendieron a normalizarse cuando el número de plaquetas disminuyó por el tratamiento. Creemos que estos resultados establecen una relación entre el aumento del número de plaquetas y la presencia de plaquetas inusualmente sensibles a la activación, así como con las complicaciones hemorrágicas y trombóticas. Como ya se demostró, las dosis de anagrelide usadas en estos pacientes con TE, si bien son suficientes para disminuir el número de plaquetas no modifican su función^{11,22}.

Está descrito en pacientes con síndromes mieloproliferativos el aumento plasmático de los marcadores de activación plaquetaria como la β -TG y el PF4^{3,8} y la agregación plaquetaria espontánea². En un estudio anterior encontramos agregación plaquetaria espontánea en 21 de 47 pacientes con TE²³. En concordancia con lo publicado por Wu y col.²⁴, esta alteración se halló más frecuentemente en pacientes que tuvieron episodios trombóticos. En este estudio encontramos aumento de los niveles plasmáticos de TXB₂, que atribuimos inicialmente al aumento de la masa plaquetaria. Sin embargo, esta hipótesis no se pudo sostener debido a la falta de correlación entre los niveles de TXB₂ y el recuento plaquetario. El aumento de la biosíntesis de TXB₂ se confirmó por la persistente elevación de los niveles de este metabolito cuando el valor se corrigió por el número de

plaquetas (Fig. 2). Dado que los niveles de TXB₂ en los controles estaban siempre dentro del rango ya establecido en el equipo comercial (< 1.0 ng/ml), pensamos que el aumento hallado en nuestros pacientes podría ser la consecuencia de un aumento de la susceptibilidad de las plaquetas para ser activadas ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Por otra parte, Nurden y col.²⁵ encontraron la presencia de plaquetas activadas en el PRP de un paciente con TE, lo que les sugirió tanto la existencia de activación plaquetaria *in vivo* como la presencia de plaquetas más susceptibles de activarse que las normales. Rocca y col.⁵ encontraron aumento del TXB₂ en un grupo de pacientes con TE que tenían alto riesgo de trombosis y el incremento de este metabolito se correlacionaba con la edad. Pensamos que estos resultados apoyarían la hipótesis de la existencia de activación plaquetaria *in vivo*. Sin embargo, en nuestros pacientes con TE no hallamos correlación entre los niveles plasmáticos de TXB₂ con la edad o las complicaciones trombóticas. Tampoco encontramos ninguna correlación entre el aumento plasmático del PDGF y el recuento de plaquetas. Con el objeto de establecer si existía un aumento de la liberación de PDGF, sus niveles se corrigieron por el número de plaquetas. Sin embargo, no se hallaron diferencias entre los valores corregidos de PDGF antes del tratamiento y durante la remisión (Fig. 1). Los pacientes presentaron niveles corregidos de PDGF más bajos que los controles y pensamos que una explicación podría ser la disminución de la síntesis de PDGF por los megacariocitos. De manera similar a lo publicado por otros autores^{26,27} encontramos disminución del PDGF intraplaquetario en 15 pacientes con TE²⁸, confirmando así una posible disminución de su síntesis. Los pacientes con TE que se hallaban en remisión hematológica y clínica por el tratamiento con anagrelide, tuvieron disminución de los niveles del TXB₂ y desaparición de la agregación espontánea²⁰ y de las manifestaciones hemorrágicas y trombóticas. Pensamos que nuestros resultados enfatizan la relación entre el número de plaquetas y la aparición de las complicaciones hemorrágicas y trombóticas en los pacientes con TE. Está demostrado que en las trombocitosis severas las manifestaciones hemorrágicas mejoran después de la disminución de las plaquetas. Se sabe también que la trombocitemia se asocia con alteraciones de la microcirculación, tales como la eritromelalgia y las manifestaciones neurológicas y visuales, mientras que éstas son poco usuales en pacientes con TE que normalizaron el número de plaquetas²⁹. Cortelazzo y col.³⁰ mostraron que el tratamiento con hidroxiurea reduce las manifestaciones trombóticas en pacientes con TE de alto riesgo y atribuyeron este efecto a la reducción del número de plaquetas. También se describió la normalización de la actividad del PDGF intraplaquetario en pacientes con SMP tratados con busulfán²⁷.

Además, van Gederen y col.⁹ comprobaron que en los pacientes con trombocitemia esencial tratados con

aspirina desaparecía la eritromelalgia. Por otra parte, Rocca y col.⁵ encontraron disminución por aspirina tanto de la 11-dehydro-TXB₂ en la orina como del nivel plasmático del TXB₂, pero no hallaron cambios del aumento de la biosíntesis del TXB₂ en 4 pacientes con TE tratados con hidroxiurea.

Consideramos que para interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que existen dos poblaciones de pacientes con TE, una clonal y otra policlonal, pero no se sabe aún cómo diferenciarlas ni por la clínica ni por el cuadro hematológico. Los valores corregidos de TXB₂ que disminuyen durante la remisión hematológica y clínica por el tratamiento pero que persisten aumentados sobre los valores normales, podrían estar en relación con este hecho.

En conclusión, la normalización de las cifras de plaquetas en estos pacientes con TE tratados con anagrelide coincide con una tendencia a la normalización de los valores plasmáticos de TXB₂ y a la desaparición de la agregación espontánea²⁰, junto con las complicaciones tromboticas y hemorrágicas.

Agradecimiento: Este trabajo de investigación se realizó con subsidios del CONICET (1997-8) y de la Fundación Pedro F. Mosoteguy.

Bibliografía

- Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984; 64: 1-12.
- Baker RI, Manoharan A. Platelet function in myeloproliferative disorders: characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. *Eur J Haematol* 1988; 40: 267-72.
- Cortelazzo S, Viero P, Barbui T. Platelet activation in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1981; 45: 211-3.
- Gersuk GM, Carmel R, Pattengate PK. Platelet-derived growth factor concentrations in platelet-poor plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 1989; 7: 2330-4.
- Rocca B, Ciabattoni G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1225-30.
- 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: 916-9.
- Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk thrombotic complications. *Blood* 1999; 93: 417-24.
- Bellucci C, Ignatova E, Jaillet M, Boffa C. Platelet hyperactivation in patients with essential thrombocythemia is not associated with vascular endothelial cell damage as judged by the level of plasma thrombomodulin, protein S, PAI-1, t-PA and vFW. *Thromb Haemost* 1993; 70: 736-42.
- van Gederen PJJ, Lucas IS, van Strik R, et al. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost* 1996; 76: 333-8.
- Orlin JB, Berkman EM. Improvement of platelet function following plateletpheresis in patients with myeloproliferative diseases. *Transfusion* 1980; 20: 540-5.
- Inceman S, Tangün Y. Platelet defects in the myeloproliferative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 201: 251-61.
- Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Ascari E. Effect of anagrelide on platelet count and function in patients with thrombocytosis and myeloproliferative disorders. *Haematologica* 1992; 77: 40-3.
- Bellucci S, Legrand C, Boval B, Drouet L, Caen J. Studies of platelet volume, chemistry and function in patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Br J Haematol* 1999; 104: 886-92.
- Gillespie E. Anagrelide: a potent and selective inhibitor of platelet cyclic AMP phosphodiesterase enzyme activity. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2866-8.
- Abe Andes W, Novek RJ, Fleming JS. Inhibition of platelet production induced by an antiplatelet drug, anagrelide, in normal volunteers. *Thromb Haemost* 1984; 52: 325-8.
- Solberg LA, Tefferi A, Oles KJ T, et al. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Brit J Haematol* 1997; 99: 174-80.
- Silverstein MN, Pettit RM, Solberg LA Jr, Fleming JS, Knight RC, Schacter LP. Anagrelide: a new drug for treating thrombocytosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1292-4.
- Murphy S, Hand H, Rosental D, Laszlo J. Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group. *Semin Hematol* 1986; 23: 177-82.
- Murphy S, Peterson P, Hand H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997; 34: 29-39.
- Laguna MS, Kornbliht LI, Marta RF, Michiels JJ, Molinas FC. Effectiveness of anagrelide in the treatment of symptomatic patients with essential thrombocythemia. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2000 (in press).
- Altman DG. Practical statistics for medical research. Chapman and Hall. London, 1991.
- Laguna MS, Correa G, Marta RF, et al. Platelet function and response to anagrelide in essential thrombocythemia. *Haemostasis* 1996; 23 (Suppl 3): 571.
- Laguna MS, Marta RF, Kornbliht LI, Santander P, Fabbro D, Molinas FC. Coexistencia de hiporreactividad y de activación plaquetaria en la trombocitemia esencial. *Rev Iberoamer Thromb Hemost* 1997; 10: 87-91.
- Wu KK. Platelet hyperaggregability and thrombosis in patients with thrombocythemia. *Ann Int Med* 1978; 88: 7-11.
- Nurden P, Bihour C, Smith M, Raymond JM, Nurden AT. Platelet activation and thrombosis: studies in a patient with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 1996; 51: 79-84.
- Katoh O, Kimura A, Itoh T, Kuramoto A. Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1990; 35: 145-50.
- Baglin TP, Price SM, Boughton BJ. A reversible defect of platelet PDGF content in myeloproliferative disorders. *Brit J Haematol* 1988; 69: 483-6.
- Lev P, Marta R, Barredo S, Molinas F. Niveles plasmáticos e intraplaquetarios de factores de crecimiento en trombocitemia esencial. *Medicina (Buenos Aires)*. 1998; 58: 577.
- Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, van Vliet HHDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993; 43: 1107-10.
- 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: 1132-6.