

AGREGACIÓN PLAQUETARIA ESTIMULADA POR L-ASPARAGINASA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LA INFANCIA

JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ, DAVID GÓMEZ ALMAGUER*

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en la infancia; con una frecuencia de 3.3 casos por cada 100,000 niños, constituye el 30% de todos los cánceres en esta edad.¹ La variedad más frecuente es originada en los linfocitos B, y comprende el 87% de los casos.¹ Con tratamiento óptimo, la tasa de curación es aproximadamente del 80%.¹ La L-asparaginasa es parte fundamental del tratamiento, e incluye diversas dosis en todos los esquemas terapéuticos.^{3,4} Su uso intensivo da resultado en mejores tasas de respuesta,^{5,6} aunque puede acompañarse de formación de anticuerpos anti-asparaginasa⁷ y reacciones de hipersensibilidad que pueden o no implicar el desarrollo de resistencia al efecto de la enzima,⁸ pero que sí obligan a cambiar a una asparaginasa de origen diferente a la de *E. Coli*, como la obtenida de *Erwinia carotobora*.

La administración de L-asparaginasa puede acompañarse además de eventos tromboembólicos graves, que se presentan con una incidencia del 2.4 al 11.5%.⁹ Diversos estudios han documentado una disminución del fibrinógeno y de las proteínas anticoagulantes C, S y Antitrombina III (ATIII) en niños que reciben tratamiento por LLA.^{10,11} Recientemente se han identificado mutaciones en estas proteínas, así como en la protrombina y el factor V.⁹ Sin embargo, éstas tienen la prevalencia esperada en la población, y por sí mismas no explican los eventos tromboembólicos, por lo que se deduce la existencia de factores procoagulantes adicionales relacionados con el tratamiento y factores ambientales.^{9,11} En esta investigación postulamos la hipó-

tesis de que la L-asparaginasa posee un efecto agonista plaquetario que contribuye al estado hipercoagulable y al riesgo de desencadenar eventos trombóticos en el niño con LLA.

Pacientes y métodos

En el estudio se siguieron los principios establecidos en la Declaración de Helsinki, y se obtuvo el consentimiento informado de ambos padres. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la institución. Se estudiaron veinte pacientes menores de 12 años de edad, con el diagnóstico de LLA de la infancia de riesgo estándar, sometidos a un protocolo de inducción de la remisión que incluyó: vincristina, 1.4 mg/ M²/i.v., prednisona, 60 mg/ M²/ día/v.o. y L-asparaginasa, 6000 U/M²/dos veces por semana, seis semanas. El grupo control incluyó a 20 individuos sanos, no fumadores, sin ingestión de antiinflamatorios no esteroideos y con tiempo de sangrado y cuenta de plaquetas normales.

En los pacientes, los estudios de agregometría plaquetaria se realizaron durante la fase de inducción de la remisión, cuando se habían recibido al menos cuatro dosis de L-asparaginasa, y la cuenta de plaquetas era $>100 \times 10^9/L$, utilizando un méto-

*Servicio de Hematología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Dirección: Dr. Med. José Carlos Jaime-Pérez. Edificio "Dr. Rodrigo Barragán Villarreal", 2° piso, Avenida Madero y Gonzalitos, Colonia Mitras Centro, CP: 64460, Monterrey, Nuevo León, México. Teléfonos: 8348-6136 y 8348-8510. Fax: 8675-6717. Correo electrónico: carjaime@hotmail.com

do publicado previamente¹² en un agregómetro automatizado (Chronolog modelo 530VS, Haverton, PA, USA) con integración del proceso por medio de interfase y software específicos (Aggrolink, Haverton, PA, USA). Brevemente, se obtuvieron 20 mL de sangre venosa, descartando los primeros 5 mL, sin la aplicación de torniquete, o utilizando éste con una compresión ligera, en tubos de plástico conteniendo citrato de sodio al 3.8%, en una relación 1:9 v/v. La muestra se obtuvo dentro de las 24 horas posteriores a la administración de la cuarta dosis de L-asparaginasa, cuya vida media es de 26 horas.¹³ Las plaquetas se obtuvieron preparando un plasma rico en plaquetas a 135g por 15 minutos a temperatura ambiente. Durante una segunda centrifugación, a 1500g por 15 minutos, se obtuvo el plasma pobre en plaquetas para emplearlo en la dilución y ajuste de la muestra a una cuenta de 250,000 plaquetas por 10⁹/L, y para establecer la lectura basal de agregación en 0%. Se estudiaron las respuestas a 37°C a 1000 rpm a los siguientes agonistas:¹² ristocetina, 1.5 mg/mL, adenosín difosfato (ADP) 10 mM, epinefrina 10 mM y colágeno 2.5 mg/mL. Diluciones salinas de L-asparaginasa (Leunase, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Tokio, Japón) a concentraciones de 2500, 5000 y 10000 unidades/mL en solución fisiológica al 0.9%, con un pH de 7.3, fueron empleadas como agonistas en ensayos independientes. Se agregó cada agonista en un volumen de 50 µL a una cubeta con 450 µL de la muestra y se procedió al ensayo, cada ensayo incluyó un control de voluntarios normales. El resultado, expresado como porcentaje de agregación, se analizó en la gráfica correspondiente. Se procedió a comparar las diferentes curvas generadas. La actividad funcional de la ATIII (StachromAT III, Diagnostica Stago, Asnieres-Sur -Seine, France de la proteína C-, Stachrom Protein C, Diagnostica Stago, Asnieres-Sur -Seine, France-), fue determinada por medio de un ensayo colorimétrico modificado.¹⁴ La actividad de la proteína S (Liatest Protein S, Diagnostica Stago, Asnieres-Sur -Seine, France-) se midió empleando un inmunoensayo mediado por micropartículas de látex.¹⁵

Resultados

Las características clínicas e iniciales de laboratorio de los niños con LLA se muestran en la tabla I. El resultado del ensayo con agonistas estandarizados se puede observar en las figuras 1 a 4. La agrego-

metría demostró un claro efecto proagregante de la L-asparaginasa, tanto en plaquetas de pacientes con LLA en fase de inducción (figuras 5 a 7), como en las de voluntarios normales. El porcentaje de agregación con las diluciones de la L-asparaginasa varió de 28% con una concentración de 2500 UI (figura 5), 70% con una concentración de 5000 UI (figura 6); y 105%, cuando se empleó la concentración de 10000 UI (figura 7), presentándose como una potente onda de agregación primaria en menos de un minuto del ensayo. El porcentaje de desagregación fue menor al 5% a los siete minutos de registro. Se apreció una correlación entre la concentración de la L-asparaginasa y el porcentaje de agregación plaquetaria en ambos grupos. No se detectaron diferencias en la agregometría entre las plaquetas de individuos sanos y de pacientes con LLA, ni con agonistas usuales ni con las diferentes concentraciones de L-asparaginasa.

La concentración de proteínas anticoagulantes se reporta como la media \pm la desviación estándar y el rango de los porcentajes de actividad correspondientes. Los valores para la proteína C fueron 99.84 ± 27.48 (rango:45-157), para la proteína S, 92.63 ± 16.75 (rango:76-126) y para la AT III, 100.31 ± 25.40 (rango:46-133).

Uno de los pacientes, una niña de 4 años de edad, desarrolló trombosis en el hemisferio cerebral derecho, documentada por tomografía axial computarizada, después de la administración de la tercera dosis de L-asparaginasa, cuando su cuenta plaquetaria era de solamente $20 \times 10^9/L$. Su patrón de respuesta en la agregometría resultó similar a la de los otros pacientes, con respuesta de agregación *in vitro* al estímulo de la L-asparaginasa. A un año del evento la paciente se encuentra en rehabilitación con hemiparesia densa persistente.

Discusión

La disminución de las proteínas anticoagulantes C, S y ATIII ha sido reconocida como una de las causas principales del estado hipercoagulable en niños con LLA.⁹ Dicho estado puede conducir a eventos trombóticos graves, y se cree que es el resultado de la quimioterapia administrada¹⁰ y factores todavía no identificados.⁹ La L-asparaginasa en dosis elevadas forma parte integral del tratamiento exitoso de la LLA de la infancia, y ha sido relacionada con el estado hipercoagulable durante la fase de inducción de la remisión¹⁶ y con el desarrollo de

anticuerpos específicos y reacciones de hipersensibilidad,¹⁷ que obligan a utilizar una asparaginasa de origen diferente al de E coli,⁸ y un protocolo de desensibilización.¹⁸ En este estudio las proteínas C, S y ATIII estuvieron dentro del rango normal, probablemente debido a que la toma de la muestra fue extemporánea a los efectos inducidos por la enzima.

La L-asparaginasa ha sido estudiada con relación al desarrollo del estado hipercoagulable de la LLA en asociación con la disminución de las proteínas C, S y ATIII. Sin embargo, la L-asparaginasa no ha sido, hasta donde sabemos, estudiada o involucrada en la activación de la fase plaquetaria de la coagulación, ni empleada como agonista en estudios de los efectos proagregantes de otros agentes.

En este estudio se demostró claramente que la L-asparaginasa puede actuar como un potente agonista plaquetario *in vitro*, en forma proporcional a su concentración, lo mismo en plaquetas de niños con LLA que en las de individuos sanos, libres de patología plaquetaria. Aunque este efecto proagregante no ha sido documentado *in vivo*, su administración podría ser uno de los factores protrombóticos relacionados al tratamiento no identificados, y cuya existencia se sugirió en estudios previos.⁹ En conjunto con la disminución de las proteínas anticoagulantes naturales, un efecto proagregante de la enzima podría contribuir al estado hipercoagulable observado en la fase inicial del tratamiento de la LLA.¹⁰

Recientemente se ha reportado que el alcaloide de la vinca, vincristina, utilizado en conjunto con la L-asparaginasa en la fase de inducción de la remisión de la LLA, es capaz de inducir apoptosis *in vivo* de células mononucleares malignas, con un índice apoptótico de hasta un 40%.¹⁹ La apoptosis participa en un numeroso grupo de fenómenos biológicos, entre ellos, de manera notable, la trombogénesis, probablemente a través de la activación del factor tisular,²⁰ se sabe que la interacción de las plaquetas con las células mononucleares en otras enfermedades, como el lupus eritematoso sistémico, acelera la producción del factor tisular por los monocitos activados,²¹ algo similar podría suceder por medio de la interacción entre plaquetas y linfoblastos apoptóticos. La formación de estos complejos heterotípicos circulantes, que pudieran contribuir al estado hipercoagulable, ha sido documentada entre plaquetas y neutrófilos,²² y entre plaquetas y células mononucleares,²³ por lo que cabe la

posibilidad de su formación entre plaquetas y linfoblastos leucémicos.

Es posible que un estado de agregación plaquetaria aumentada debido a la administración de L-asparaginasa, como se documentó *in vitro* en este estudio, en combinación con la disminución en la síntesis de las proteínas anticoagulantes naturales C, S y ATIII, aunada a los fenómenos apoptóticos procoagulantes secundarios a la utilización de vincristina, ayude a explicar de manera más completa el desencadenamiento de fenómenos trombóticos en la fase de inducción de la remisión de la LLA de la infancia. Una agregometría plaquetaria ha sido previamente sugerida en pacientes con desórdenes mieloproliferativos y eventos trombóticos²⁴ y pudiera estar indicada, utilizando diluciones de la L-asparaginasa como agonista adicional, para identificar el subgrupo de niños en riesgo de sufrir eventos trombóticos, con el fin de evaluar la administración de anticoagulantes de manera profiláctica, como se ha propuesto para el uso de la heparina de bajo peso molecular en aquellos pacientes en los que se

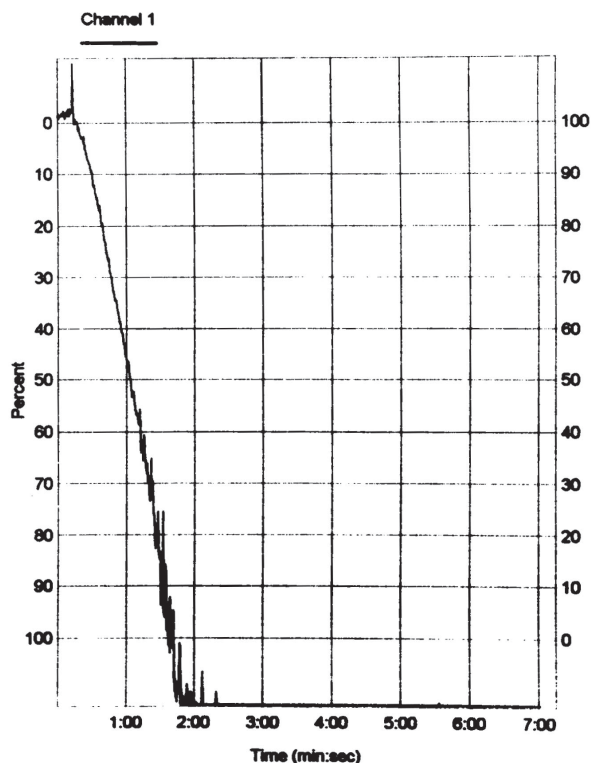


Fig. 1. Agregometría plaquetaria mostrando 105% de agregación. Respuesta observada al estímulo agonista de la ristocetina en plaquetas de individuos sin patología plaquetaria y en pacientes con LLA de la infancia, a una concentración de 1.5 mg/mL.

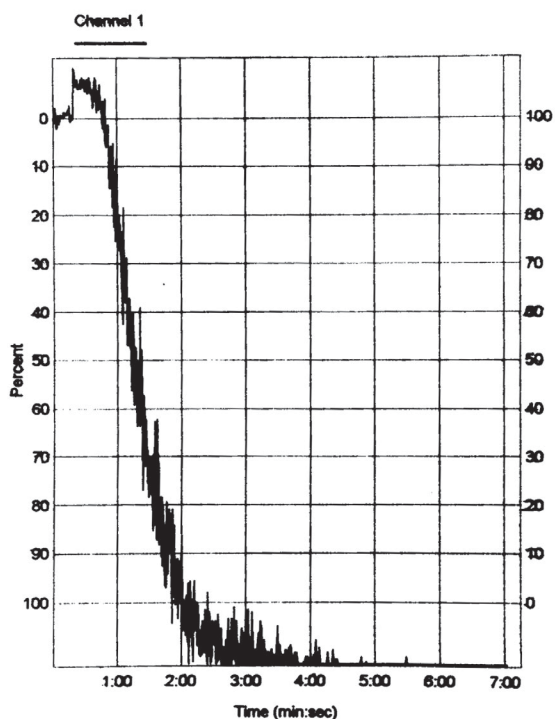


Fig. 2. Agregometría plaquetaria mostrando un 110% de agregación. Respuesta típica al estímulo agonista del ADP $10\mu\text{M}$ en plaquetas de individuos sin trombocitopatía y en niños con LLA de la infancia.

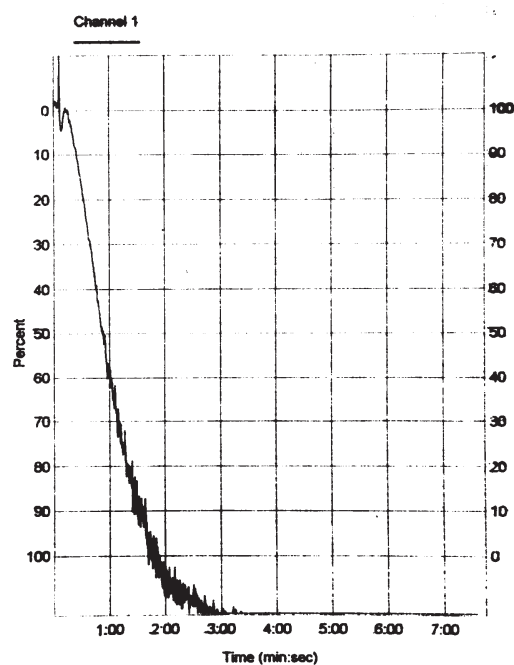


Fig. 4. Agregometría plaquetaria mostrando un 110% de agregación. Respuesta observada al estímulo agonista del colágeno, $2.5\mu\text{g/mL}$, en plaquetas de individuos sin trombocitopatía y en pacientes con LLA de la infancia.

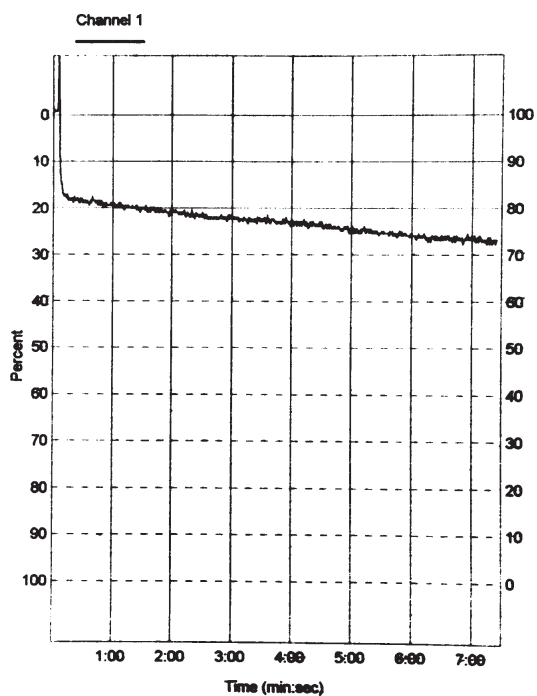


Fig. 3. Agregometría plaquetaria mostrando un 93% de agregación. Respuesta observada al estímulo agonista de la epinefrina $10\mu\text{M}$ en plaquetas de individuos sin patología plaquetaria y en pacientes con LLA de la infancia.

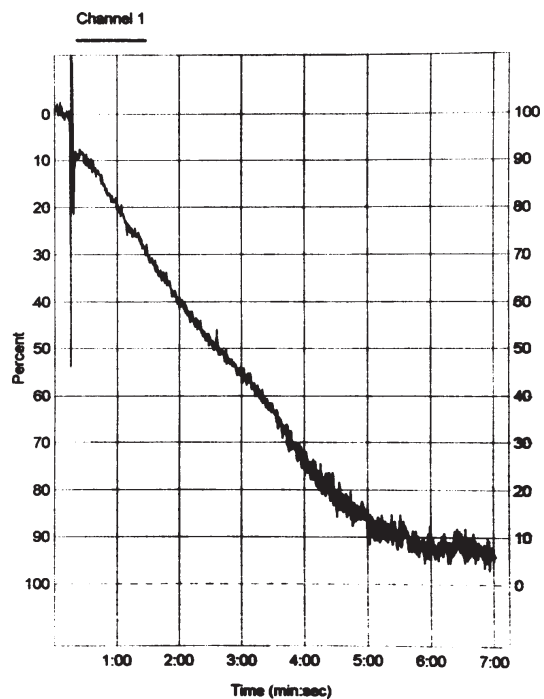


Fig. 5. Agregometría plaquetaria mostrando un 28% de agregación en respuesta al estímulo agonista de la L-asparaginasa a una concentración de $2500\text{ UI}/500\mu\text{L}$ en plaquetas de niños con LLA de la infancia y en voluntarios sanos.

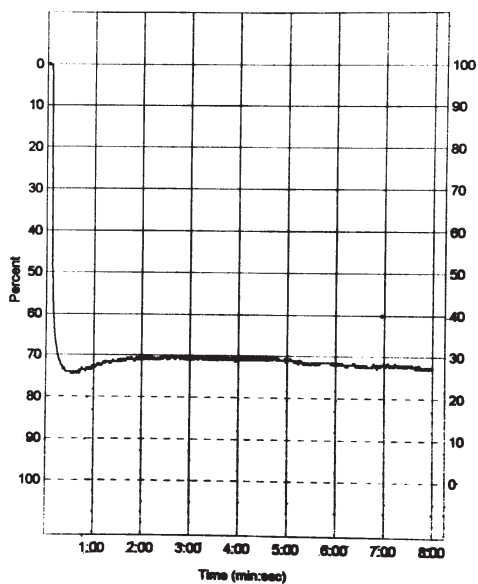


Fig. 6. Agregometría plaquetaria mostrando un 70% de agregación en respuesta al estímulo agonista de la L-asparaginasa a una concentración de 5000 UI/500µL en plaquetas de niños con LLA de la infancia y en voluntarios sanos.

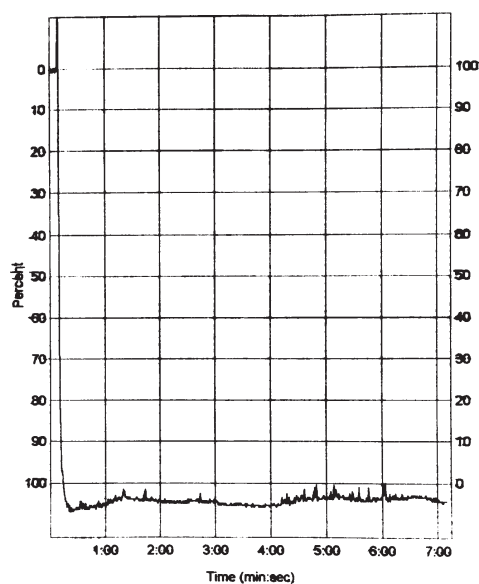


Fig. 7. Agregometría plaquetaria mostrando un 105% de agregación en respuesta al estímulo agonista de la L-asparaginasa a una concentración de 10000 UI/500µL en plaquetas de niños con LLA de la infancia y en voluntarios sanos.

Tabla I. Características clínicas y de laboratorio de los niños con leucemia linfoblástica aguda.

No.	Sexo	Edad	Hb*	Leucocitos	Plaquetas	Fenotipo	Alb¶	PT†	Ig G‡
1	M	4	4.8	13600	80000	B	2.8	6.3	400.2
2	F	5	5.4	89400	20700	B	2.7	6	1209
3	M	13	8.9	7806	114000	B	3.5	7.2	471.5
4	M	6	5.8	2720	51100	B	3.8	6.7	900.8
5	M	8	5.9	51300	7000	B	3.3	6.5	799.4
6	F	7	6.2	105000	31300	B	2.7	6.7	845
7	M	13	5	27600	176000	B	3.9	7.5	702
8	M	4	5.6	3700	24000	B	3.9	6.1	775
9	F	2	8.5	8540	31300	B	3.7	6.4	1012
10	F	2	6.6	10900	259000	B	2.4	5.9	945
11	M	13	7.5	948	83500	B	3.5	7.9	502
12	F	13	8.9	36400	1190	B	4.8	6.9	1163
13	M	3	3.4	23200	11000	B	3.7	6.4	1049
14	F	6	6.5	48100	13900	B	3.7	6.5	1116
15	F	2	6.4	3610	16000	B	4.8	6	1163
16	M	11	6.3	170,000	83,600	B	2.8	5.6	978
17	F	1	7.29	38,200	218,000	B	2.9	5.5	568
18	F	9	5.5	47,400	16,900	B	3.8	7	1034
19	M	2	4.5	117,000	13,600	B	3.9	6.9	762
20	F	5	10.9	1,040	54,400	B	3.5	4.8	79
Media		6.37	6.26	39,435	65,482	B	3.38	6.18	833
Des. Est.		4.04	1.98	43,178	70,132	B	0.86	1.39	256

* Hemoglobina, g/L, ¶Albúmina, g/L, †Proteínas totales, g/L, ‡Inmunoglobulina G, mg/L

identifica una disminución significativa de proteínas anticoagulantes C, S y ATIII.⁹

Resumen

Antecedentes. La L-asparaginasa forma parte del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), pudiendo acompañarse de complicaciones tromboticas. Investigamos si la L-asparaginasa posee un efecto agregante plaquetario que contribuya al estado protrombótico.

Pacientes y métodos. Se estudiaron veinte niños con LLA tratados con L-asparaginasa, 6000 U/M²/dos veces por semana/seis semanas. El control consistió de 20 individuos sanos. Se efectuó agregometría plaquetaria después de la cuarta dosis de L-asparaginasa con ADP, adrenalina, colágeno y ristocetina. Diluciones de L-asparaginasa de 2500, 5000 y 10000 unidades fueron ensayadas como agonistas.

Resultados

Se demostró un efecto proagregante de la L-asparaginasa en plaquetas de pacientes con LLA y en las de voluntarios normales.

Conclusiones: La L-asparaginasa es un agonista plaquetario *in vitro*. Este efecto podría ser uno de los factores protrombóticos no identificados previamente.

Palabras clave: Trombosis, L-asparaginasa, Agregometría plaquetaria, Leucemia linfoblástica aguda.

Abstract

L-asparaginase is part of the treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL), however, it can cause thromboembolic events. We tested for a direct platelet agonist effect of L-asparaginase. Patients and methods. Twenty ALL children were treated twice a week with L-asparaginase, 6000 UI/ M²/IM/ 6 weeks. The control group was made up of twenty healthy donors. Platelet aggregometry was performed within 24 hours after the fourth L-asparaginase dose. Agonists included ADP, adrenaline, collagen and ristocetin. L-asparaginase at 2500, 5000 and 10000 units were tested as agonist. Results. Platelet aggregometry demonstrated a clear agonist effect of L-asparaginase in both, ALL patients and normal volunteers. Conclusion. L-asparaginase acts as a potent platelet agonist *in vitro*. This effect could

be one of the unidentified prothrombotic factors previously suggested.

Keywords: Thrombosis, L-asparaginase, Platelet aggregometry, Acute lymphoblastic leukemia.

Referencias

1. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia, in Williams Hematology, 6th ed, Beutler E, Lichtman M, Coller B, and Seligson U (eds), p 1141-1161. McGraw Hill, New York, 2001.
2. Greaves M. Science, Medicine and the Future. Childhood leukemia. Br Med J 2002;324:283-7
3. Felix CA, Lange BJ, Chessells JM. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematology 2000;*:285-302.
4. Richards S, Burrett J, Hann I, Chessells J, Hill F, Bailey C. Improved survival with early intensification: combined results from the Medical Research Council childhood ALL randomized trials, UKALL X and UKALL XI. Medical Research Working Party on Childhood Leukemia. Leukemia 1998;12:1031-1036.
5. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N Eng J Med 1998;338:1663-1671.
6. Amylon MD, Shuster J, Berard C, Link MP, Wharam M. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. Leukemia 1999;13:335-342.
7. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Rivera GK, et al. Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1998;12:1257-1533.
8. Larson RA, Fretzin MH, Dodge RK, Schiffer CA. Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1998;12:660-665.
9. Nowak-Gotti U, Wermes C, Junker R, Koch HG, Schobess R, Fleischhack G. Prospective evaluation of the thrombotic risk in children with

- acute lymphoblastic leukemia carrying the MTHFR TT 667 genotype, the prothrombin G20210A variant, and further prothrombotic risk factors. *Blood* 1999;93:1595-1599.
10. Mitchell LG, Sutor AH, Andrew M. Hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia : coagulopathy induced by disease or treatment. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:390-401.
 11. Corso A, Castagnola C, Bernasconi C. Thrombotic events are not exclusive to the remission induction period in patients with acute lymphoblastic leukemia: a report of two cases of cerebral sinus thrombosis. *Ann Hematol* 1997;75:117-119.
 12. McCabe WM, Jennings LK. Laboratory evaluation of platelet function, in: *Platelet Protocols, Research and Clinical Laboratory Procedures*, McCabe WM and Jennings LK, (eds) p. 40-50. Academic Press, San Diego, CA, 1999.
 13. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon OS, Hilden JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holsenberg JS. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 2002;99:1986-1994.
 14. Guglielmo HA, Vides MA. A novel functional assay of protein C in human plasma and its comparison with amidolytic and anticoagulant assays. *Thromb Haemost* 1992;67:46-49.
 15. Laroche P, Plassart V, Amiral J. Rapid quantitative latex immunoassays for diagnosis of thrombotic disorders. *Thromb Haemostasis* 1989;62:379-381.
 16. Castaman G, Rodeghiero F, Dini E. Thrombotic complications during L-asparaginase treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 1990;75:567-569.
 17. Woo MH, Hak LI, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Harrison PL, Wang B, Evans WE, Pui CH, Relling MV. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:1525-1532.
 18. Bonno M, Kawasaki H, Hori H, Umemoto M, Sakurai M,. Rapid desensitization for L-asparaginase sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:497-572.
 19. Groninger E, de Graaff SSN, Meeuwesen-de-Boer GJ, Sluiter WJ, Poppema S. Vincristine induced apoptosis in vivo in peripheral blood mononuclear cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2000;111:875-878.
 20. Wang J, Weiss I, Svoboda K, Kwaan C. Thrombogenic role of cells undergoing apoptosis. *Br J Haematol* 2001;115:382-391.
 21. Silverstein RL, Nachman RL. Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 1987;79:867-874.
 22. 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
 23. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989; 59:305-312
 24. Manoharan A, Gemmell R, Brighton T, Dunkley S, Lopez A, Kkyle P. Thrombosis and bleeding in myeloproliferative disorders: identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies. *Br J Haematol* 1999;105:618-625.