

**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Tesina para optar por el título de Magíster en Biología Molecular Médica de la  
Universidad de Buenos Aires**

**“Estudios Genéticos en Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1*  
negativos”**

**Autora: Bqca. Natalia Soledad Girardi**

**Co-directora: Dra. Mariana Gonzalez**

**Directora: Dra. Irene Larripa**

**Año 2016**

## RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas (NMPs *BCR-ABL1*-) integran un grupo heterogéneo de patologías mieloides, siendo las más frecuentes la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MF). La mayoría de estas patologías se asocian con mutaciones en el gen *JAK2* (V617F). Luego de adquirida la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>, puede producirse un fenómeno denominado pérdida de heterocigosidad (LOH). Estos eventos llevan a la homocigosidad de la mutación, introduciéndose el concepto de carga alélica (CAL).

En este trabajo se estudiaron 41 pacientes incluyendo: 21 PV, 11 TE y 9 MF, se cuantificó la carga alélica y expresión de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> mediante PCR cuantitativa (QPCR). Lo cual permitió la comparación de los niveles de *JAK2*<sup>V617F</sup> en muestras pareadas de ADN y ARN del mismo paciente. Los resultados promedio obtenidos de ambas mediciones fueron en MF (media  $\pm$  ES) (62,01  $\pm$  8,00), (80,89  $\pm$  10,26), en PV (59,51  $\pm$  6,01), (75,02  $\pm$  5,48) y en TE (43,08  $\pm$  6,49), (43,42  $\pm$  5,95) respectivamente, mostrando una correlación estadísticamente significativa (Spearman  $r=0,7$ ,  $p<0,0001$ ). Se observó que sólo 3 casos con diagnóstico de PV presentaban valores muy incrementados de transcritos *JAK2*<sup>V617F</sup>, considerados *outliers*, lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión del alelo mutado. La frecuencia de LOH de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en MF, PV y TE fue 66,6%, 57% y 27% respectivamente, mostrando que la TE posee menor incidencia de homocigosis de dicha mutación. Se analizaron parámetros hematológicos: recuento de glóbulos blancos (WBC), plaquetas y hematocrito, en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en las diferentes patologías, el análisis estadístico mostró un incremento significativo en el recuento de plaquetas y una tendencia al aumento de WBC en pacientes con PV con homocigosis de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>. En MF y TE no se observaron diferencias. En este estudio preliminar se pudo observar que el análisis de la carga alélica de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> podría explicar parte de las diferencias fenotípicas de las patologías incluidas en las NMPs *BCR-ABL1* (-).

## ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms *BCR-ABL1* negative (NMPs *BCR-ABL1*-) comprise a heterogeneous group of myeloid disorders, the most frequent are: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (MF). Most of these pathologies are associated with mutations in *JAK2* (V617F) gene. After the *JAK2*<sup>V617F</sup> mutation is acquired, a phenomenon called loss of heterozygosity (LOH) may occur. These events lead to homozygosity of the mutation, introducing the concept of allelic burden (CAL).

In this work were studied 41 patients including: 21 PV, 11 ET and 9 MF. The allelic burden and expression of *JAK2*<sup>V617F</sup> mutation were quantified by quantitative PCR (QPCR). Which allowed comparison between *JAK2*<sup>V617F</sup> levels in paired samples of DNA and RNA from the same patient. The average results of both measurements were in MF (mean  $\pm$  ES) (62.01  $\pm$  8.00), (80.89  $\pm$  10.26), in PV (59.51  $\pm$  6.01), (75.02  $\pm$  5.48), and in TE (43.08  $\pm$  6.49), (43.42  $\pm$  5.95) respectively. These value showed a statistically significant correlation (Spearman  $r = 0.7$ ,  $p < 0.0001$ ). It was noted that only 3 cases diagnosed with PV had an important rise of *JAK2*<sup>V617F</sup> transcripts, considered outliers, which may be associated with increased expression or overexpression of this mutation. The frequency of LOH of *JAK2*<sup>V617F</sup> mutation in these pathologies were: 66.6%, 57% and 27% for MF, PV and ET respectively, showing that the ET has lower incidence of *JAK2*<sup>V617F</sup> homozygosity. The analysis of hematological parameters (WBC count, hematocrit and platelet count) between homozygous and heterozygous patients for the *JAK2*<sup>V617F</sup> mutation showed significant increase in platelet count and a trend to rise in WBC in patients diagnosed with PV with homozygosity of *JAK2* mutation. In MF and TE statistical differences were not observed. In this preliminary study it was observed that the *JAK2*<sup>V617F</sup> allelic burden would explain part of the phenotypic differences of the hematological entities included in NMPs *BCR-ABL1* (-).

## INDICE

	Página
1. INTRODUCCION.....	7
1.1. Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas .....	7
1.2. Neoplasias Mieloproliferativas <i>BCR-ABL1</i> negativas NMPs <i>BCR-ABL1 (-)</i> .....	7
1.3. Policitemia Vera (PV).....	8
1.4. Trombocitemia Esencial (TE) .....	9
1.5. Mielofibrosis Primaria (MF) .....	10
1.6. Bases moleculares de las NMPs <i>BCR-ABL1(-)</i> .....	11
1.7. Otras mutaciones descritas en NMPs <i>BCR-ABL1 (-)</i> .....	13
1.8. Algoritmo del estudio molecular de las NMPs .....	15
1.9. Alteraciones citogenéticas en las NMPs <i>BCR-ABL1 (-)</i> .....	16
1.10. Activación y vías de señalización de JAK2 en NMPs <i>BCR-ABL1(-)</i> .....	17
1.11. Terapias en NMPs <i>BCR-ABL1(-)</i> .....	20
2. OBJETIVOS .....	25
3. MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1. Población estudiada .....	27
3.2. Lisis celular .....	28
3.3. Extracción de ADN.....	28
3.4. Extracción de ARN total.....	29
3.5. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR) .....	29
3.6. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) .....	30
3.7. Cálculo de carga alélica .....	31
3.8. Análisis estadístico .....	31
4. RESULTADOS .....	33
4.1. Determinación del rango dinámico para la cuantificación de la carga alélica de la mutación V617F .....	33
4.2. Cuantificación de carga alélica y expresión de <i>JAK2<sup>V617F</sup></i> en pacientes con NMPs <i>BCR-ABL1 (-)</i> .....	36
4.3. Carga alélica a nivel genómico y transcripcional de la mutación <i>JAK2<sup>V617F</sup></i> .....	39
4.4. Pérdida de heterocigosidad (LOH) de la mutación <i>JAK2<sup>V617F</sup></i> y análisis de pacientes homocigotas .....	40
4.5. Análisis comparativo de parámetros hematológicos en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación <i>JAK2<sup>V617F</sup></i> .....	41
5. DISCUSION .....	46

6. CONCLUSIONES ..... 51

7. BIBLIOGRAFIA..... 53

## ***1. INTRODUCCION***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs) son patologías hematológicas que se caracterizan por la proliferación de alguno de los linajes mieloides: eritroide, megacariocítico o granulocítico (Jaime Pérez et al, 2009).

Su denominación ha cambiado de “Síndromes Mieloproliferativos” a “Neoplasias Mieloproliferativas” con el fin de reflejar con exactitud su naturaleza neoplásica, ya que la mieloproliferación deriva de la transformación maligna de una stem cell hematopoyética (Vardiman et al, 2009).

La OMS clasifica a este grupo de entidades de acuerdo a criterios morfológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos en ocho subtipos de neoplasias mieloproliferativas: Leucemia Mieloide Crónica *BCR-ABL1* positiva (LMC), Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC), Policitemia Vera (PV), Mielofibrosis Primaria (MF), Trombocitemia Esencial (TE), Mastocitosis (M), Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y un grupo de neoplasias mieloproliferativas crónicas no clasificable (Tefferi et al, 2009). Exceptuando la LMC, todos los subtipos restantes carecen del reordenamiento *BCR-ABL1* por este motivo se los denomina en forma genérica en NMPs *BCR-ABL1* negativas.

### 1.2. Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas NMPs *BCR-ABL1* (-)

Las NMPs *BCR-ABL1* (-) incluyen enfermedades hematopoyéticas clonales en las que hay una transformación de la célula madre pluripotencial, existe sobreproducción de una o más de las líneas mieloide, eritroide o megacariocítica, sin la presencia de un estímulo definido (Jaime Pérez et al, 2009). Se caracterizan por una médula ósea hipercelular. La hematopoyesis es efectiva y da lugar a un incremento en el número de células correspondientes en sangre periférica. Poseen una gran diversidad fenotípica que

se relaciona con distintos eventos oncogénicos que frecuentemente involucran a una proteína con actividad tirosina quinasa. En determinados casos puede existir evolución a fibrosis con fallo en la médula ósea o transformación leucémica. Entre las NMPs *BCR-ABL1* (-) se incluyen la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MF), consideradas como las NMPs *BCR-ABL1* (-) clásicas.

En el año 2005, un grupo de investigadores describieron como causa genética de estas entidades, una mutación puntual en el gen *JAK2* (V617F) que codifica para una tirosina quinasa citoplasmática. Dicha mutación se observó en aproximadamente un 90% de pacientes con PV, y en alrededor del 50% de los casos de MF y TE.

La Policitemia Vera (PV) fue descrita por primera vez en 1892, cuando Luis Enrique Vaquez observó a un paciente con una marcada eritrocitosis y esplenomegalia como resultado de una proliferación celular hematopoyética.

La Mielofibrosis Primaria (MF) fue descrita por Gustav Hueck tras notar la presencia de fibrosis medular y hematopoyesis extramedular. La Trombocitemia Esencial (TE) fue la última en ser descrita, cuando en 1934, Emil Epstein y Alfred Godel reconocieron que los pacientes con trombocitosis sin marcada eritrocitosis constituían una clínica diferente. Aunque han sido reconocidas como entidades distintas, William Dameshek (1951), fue el primero en reconocer que estas entidades deberían ser clasificadas como un grupo de “desordenes mieloproliferativos” fenotípicamente relacionados. Si bien la eritrocitosis es característica de la PV, muchos pacientes presentaban “pancitosis” con proliferación eritroide, megacariocítica y granulocítica. También señaló que algunos desarrollaban fibrosis medular, leucoeritroblastosis en sangre periférica y esplenomegalia consistente con progresión a mielofibrosis terminal.

### **1.3. Policitemia Vera (PV)**

Es una enfermedad clonal de células progenitoras hematopoyéticas, con una proliferación trilineal, predominantemente de células eritroides, con aumento de hematíes circulantes fenotípicamente normales (SAH, 2015). La Médula ósea es



hiperplásica, con valores elevados de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto), acompañada en algunos casos de leucocitosis, trombocitosis, esplenomegalia, hepatomegalia y otros focos de hematopoyesis extramedular (HEM).

Los síntomas y signos podrían atribuirse en gran parte al aumento de espacio vascular y volumen sanguíneo, y a la lentitud del flujo de la sangre debido al aumento de la viscosidad. La incidencia varía de 0,5 a 1,9 casos cada 100.000 hab/año. La mayoría de casos se presentan entre los 40 y 70 años, con una media de 60 años.

La evolución típica es en dos etapas; fase policitémica asociada a un incremento en la masa eritrocitaria, la cual puede progresar a una fase postpolicitémica o de MF post PV; tal evolución se debe a la presencia de precursores inmaduros mieloides y/o dacriocitos en sangre periférica, disminución de la hemoglobina no relacionada al tratamiento, aumento de la LDH, disminución de las plaquetas y aumento de leucocitos y del tamaño del bazo.

La identificación de la mutación  $JAK2^{V617F}$ , en la mayoría de los casos, la histopatología de médula ósea y las alteraciones hematológicas permiten realizar el diagnóstico y detectar estadios tempranos de PV diferenciándola de otras neoplasias mieloproliferativas. Las complicaciones más frecuentes en estos pacientes son eventos trombóticos o hemorrágicos, la evolución a MF o la transformación a leucemia.

#### **1.4. Trombocitemia Esencial (TE)**

Es un trastorno mieloproliferativo crónico de origen clonal de las células pluripotenciales (Jaime Pérez et al, 2009) donde se encuentra comprometida principalmente la línea de megacariocitos de medula ósea (MO). Se caracteriza por una persistente trombocitosis ( $>450000/\mu\text{l}$ ) e hiperplasia megacariocítica en ausencia de eritrocitosis o leucoeritroblastosis (SAH, 2015). Es probablemente la neoplasia más común con una incidencia de 1-2,5 casos cada 100000 hab/año. Suele presentarse en la edad adulta entre los 50 y 60 años, sin predilección por el sexo, con un segundo pico de incidencia a los 30 años con predominio en las mujeres 2:1, y es poco frecuente en niños

(SAH, 2015). El curso de esta patología es relativamente benigno con mayor frecuencia de complicaciones tromboticas (15-25%), siendo las arteriales más frecuentes (60-70%) que las trombosis venosas, también complicaciones hemorrágicas y un aumento del riesgo de transformación a una neoplasia hematológica más severa como la MF-Post TE en 4-5% a 10 años y menos frecuente es la transformación a leucemia. Alrededor del 50%- 60% de los pacientes con TE presentan la mutación  $JAK2^{V617F}$ , entre el 25%-30% poseen mutaciones en el gen *CALR* y entre 1-4% en el gen receptor de trombopoyetina (gen *MPL*). Aquellos pacientes que son portadores de  $JAK2^{V617F}$  presentan características que se asemejan a la PV: mayor nivel de hemoglobina, mayor recuento leucocitario y de neutrófilos, menor recuento plaquetario, con una mayor población de progenie eritroide y mieloide en MO, mayor frecuencia de trombosis venosa y niveles más bajos de ferritina y eritropoyetina (EPO).

### **1.5. Mielofibrosis Primaria (MF)**

Es un trastorno clonal de las células precursoras hematopoyéticas caracterizada por fibrosis progresiva de la MO y el desarrollo de hematopoyesis extramedular (HEM) (SAH, 2015). En esta patología se pueden detectar las mismas mutaciones iniciadoras descritas en la TE, es decir, mutaciones en  $JAK2^{V617F}$ , en *CALR* y en *MPL* en aproximadamente el 60%, 30% y 10% respectivamente. Evoluciona con anemia y la presencia en sangre periférica de elementos inmaduros mieloides y precursores eritroides (leucoeritroblastosis), dacriocitos (hematíes en lágrima) y esplenomegalia. Además estos pacientes pueden presentar fatiga, dolor óseo, sudoración nocturna y pérdida de peso. Es el síndrome mieloproliferativo crónico menos frecuente con una incidencia de 0,5-1,5 casos cada 100.000 hab/año. Es un proceso reactivo inducido por fibroblastos como consecuencia de la liberación de citoquinas a partir de granulocitos y megacariocitos. Al momento del diagnóstico casi todos los pacientes presentan síntomas clínicos, un 60% anemia, un 24% esplenomegalia y el 16% restante sangrado anormal. La OMS (2008) propuso que para el diagnóstico de MF, deben reunirse 3 criterios mayores:

1. Presencia de proliferación y atipía de megacariocitos, fibrosis reticulínica o colagénica.
2. Ausencia de criterios de la WHO para PV, LMC, SMD u otros desórdenes mieloides.
3. Presencia de clonalidad (mutación  $JAK2^{V617F}$ , en *CALR* o en *MPL*), o, en ausencia de los marcadores clonales, que no haya evidencia de MF secundaria.

Además deben cumplirse al menos dos criterios menores: leucoeritroblastosis, aumento de LDH, anemia, esplenomegalia.

Esta entidad es la de peor pronóstico, con una expectativa de vida estimada entre 5-7 años que excede los 10 años en pacientes jóvenes con factores pronósticos favorables (SAH, 2015). Las principales causas de muerte son infección, eventos trombohemorrágicos, fallo cardíaco y transformación leucémica. Actualmente el tratamiento es paliativo y la única cura es el trasplante alogénico de médula ósea.

#### **1.6. Bases moleculares de las NMPs *BCR-ABL1(-)***

En el año 2005, cinco grupos de investigadores (Kralovicks et al, 2005), (Baxter et al, 2005), (James et al, 2005), (Levine et al, 2005), (Zhao et al, 2005) describieron una mutación somática y adquirida en el exón 14 del dominio pseudoquinasa del gen *JAK2* (Janus Kinasa 2), localizado en el cromosoma 9p24. Dicha mutación provoca la fosforilación (activación) constitutiva de la proteína e incrementa la hipersensibilidad por las citoquinas activando distintas vías de señalización como JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT en ausencia de unión al ligando. Esta mutación ocurre por una sustitución de guanina por timina (G>T) en la posición 1849 del exón 14, lo que resulta en el reemplazo de una valina por una fenilalanina en la posición 617 de la proteína, por lo tanto se denomina a la mutación  $JAK2^{V617F}$ . Las tirosinas quinasa no receptoras de la familia Janus kinasa incluye a JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 (Levine and Gilliland, 2008). Contienen dominios homólogos denotados como JH, que son, desde el extremo C-terminal al N-terminal: JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6 y JH7 (Constantinescu et al, 2013) (Figura 1). El dominio JH1, en el extremo C-terminal, contiene el dominio catalítico, mientras que el dominio JH7 en el extremo N-

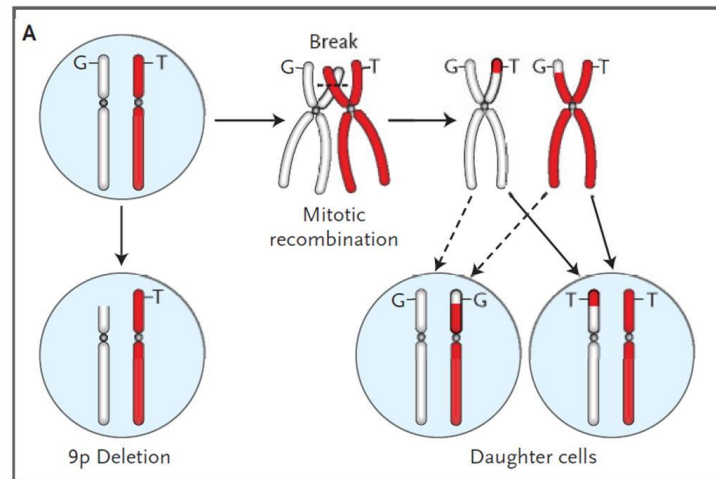
terminal ha demostrado ser esencial en la unión a receptores de citoquinas. La valina 617 se encuentra en el dominio JH2, o dominio pseudoquinasa, el cual carece de actividad catalítica. La delección del dominio JH2 provoca un aumento de la actividad quinasa JAK2, por lo que se ha sugerido que el dominio JH2 regula negativamente la actividad de la quinasa JH1. Las quinasas JAK, a través de su asociación con citoquinas y los receptores de tirosinas quinasas son fundamentales para la señalización de citoquinas y transducción de señales en todas las células de mamíferos (Levine and Gilliland, 2008).



**Figura 1:** Representación de la estructura primaria de JAK2 que consta de siete dominios JH. La mutación puntual V617F está situada en el dominio pseudoquinasa. Mutaciones en el *linker* entre el dominio –SH2 y el dominio pseudoquinasa, también llevan a la activación de JAK2.

Luego de adquirir la mutación  $JAK2^{V617F}$ , puede producirse un fenómeno el cual se denomina pérdida de heterocigosidad (LOH), que podría ser el resultado de deleciones de la región telomérica del cromosoma 9p o de recombinación mitótica entre cromátidas homólogas del cromosoma 9p (Figura 2). En el caso de una delección, se esperaría encontrar sólo una copia del ADN para la región delecionada, mientras que dos copias idénticas se deberían esperar en el caso de recombinación mitótica (Kralovics et al, 2005). Estos eventos llevan a la homocigosidad de la mutación, introduciéndose el concepto de carga alélica (CAL), la cual se evalúa realizando la relación porcentual entre la cantidad de ADN de  $JAK2$  mutado respecto del total de ADN de  $JAK2$ , según la siguiente fórmula:  $CAL = [JAK2^{V617F} / JAK2^{V617F} + JAK2^{WT}] \times 100$ . Cuando este cálculo arroja valores superiores a 50% se infiere presencia de homocigosidad de la mutación. Los casos con mayores porcentajes de carga alélica se asocian con enfermedad de larga evolución, gran esplenomegalia, tratamiento citorreductor, mayor probabilidad de complicaciones tales como trombosis, mielofibrosis y riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda. El fenómeno de

homocigosidad de la mutación se ha reportado en un 30% de pacientes con PV y MF comparado con 2-4% en TE (Vannucchi et al, 2008).



**Figura 2. Mecanismo de 9p LOH.** En blanco se representa el cromosoma 9 con la secuencia wild-type de JAK2, y en rojo se observa el cromosoma 9 con la transversión G>T. A la izquierda se esquematiza la deleción de la región telomérica del cromosoma 9 wild-type como un posible mecanismo para 9pLOH. A la derecha se representa la recombinación mitótica que también podría resultar en 9pLOH. En este caso se observa la progenie celular resultante luego de la recombinación mitótica de la región cromosómica 9p (Kralovics et al, 2005).

### 1.7. Otras mutaciones descriptas en NMPs *BCR-ABL1* (-)

Aunque la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> constituye la alteración molecular más frecuente en pacientes con PV, se han reportado evidencias de que algunos casos no manifiestan dicha mutación. Scott y colaboradores, han identificado varias mutaciones somáticas en el exón 12 de *JAK2*, siendo la más frecuente la que se produce en el residuo K539L, en pacientes con eritrocitosis idiopática y PV negativas para *JAK2*<sup>V617F</sup>. Dichas mutaciones se reportan como cambios puntuales, deleciones o inserciones que afectan a la zona de unión entre los dominios SH2 y JH2 y producen un efecto similar al de la mutación V617F. Estas alteraciones se asocian a un fenotipo más eritroide, con un curso clínico semejante al de pacientes que presentan la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>, y no se han descripto en casos de TE o de

MF. Estos datos sugieren que diferentes mutaciones que activan *JAK2* están asociadas con diferentes fenotipos clínicos. Las mutaciones del exón 12 se han descrito entre los aminoácidos 537 (fenilalanina) y 544 (ácido aspártico) (Pietra et al, 2008), y se detectan en el 4% de las PV.

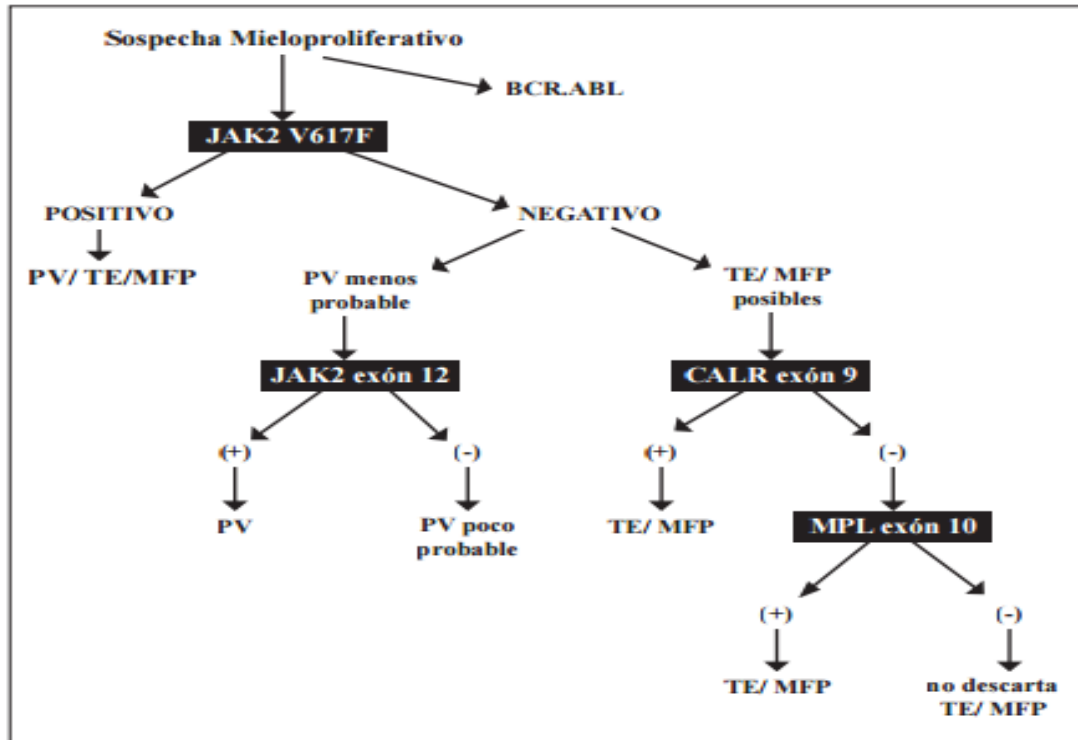
Aproximadamente el 8-10% de los pacientes con TE y MF que no presentan *JAK2*<sup>V617F</sup> portan una mutación puntual en la posición 515 del exón 10 del gen del receptor de trombopoyetina, *MPL* (W515L), siendo la más común de las mutaciones que se han reportado en dicho gen, también se han detectado las siguientes W515K, W515A, W515S (Milosevic Feenstra et al, 2016). Esta mutación sustituye leucina o lisina por triptófano. La misma induce la actividad constitutiva independiente de citoquinas de la vía de JAK-STAT y su expresión resulta en un fenotipo caracterizado por marcada y mielofibrosis. En pacientes con MF que portan la mutación *MPL*<sup>W515L</sup>, se reportó que presentarían un fenotipo más severo de anemia y mayor probabilidad de requerir soporte transfusional (Guglielmelli et al, 2007). Estos datos sugieren que los progenitores *MPL*<sup>W515L</sup> positivos, tienen inclinación hacia el linaje megacariocítico y que existen diferencias en la señalización entre *JAK2*<sup>V617F</sup> y *MPL*<sup>W515L</sup> influyendo en el fenotipo clínico.

Dos grupos de investigación (Klampft et al, 2013) y (Nangalia et al, 2013) lograron identificar mutaciones somáticas en el exón 9 del gen de calreticulina (*CALR*). Tales mutaciones se encuentran en 25%-30% de los pacientes con TE y MF que carecen de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> y en *MPL* indicando que dichas mutaciones son mutuamente excluyentes. El gen *CALR* se ubica en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13). Las mutaciones en este gen son principalmente deleciones o inserciones, las cuales modifican el dominio C-terminal de la proteína. La mayoría causa un desplazamiento en el marco de lectura. Calreticulina es una proteína altamente conservada con múltiples funciones, dentro del retículo endoplásmico asegura el correcto plegado de glicoproteínas recién sintetizadas y modula la homeostasis del calcio, fuera del retículo endoplásmico está implicada en diversos procesos biológicos incluyendo la proliferación, apoptosis y muerte celular inmunogénica. Diferentes estudios clínicos sugieren que pacientes que portan la mutación *CALR*(+) presentan recuentos plaquetarios más elevados y niveles de

hemoglobina más bajos que los pacientes  $JAK2^{V617F}$ , además muestran un curso clínico más favorable y mejor pronóstico en comparación con aquellos trastornos asociados a mutaciones en  $JAK2$  o  $MPL$ , con menor riesgo de trombosis y mayor supervivencia.

### **1.8. Algoritmo del estudio molecular de las NMPs**

Ante la sospecha de una NMP, el algoritmo molecular diagnóstico implica, primero descartar el rearreglo  $BCR-ABL1$ , típico de la LMC, y continuar con la búsqueda de la mutación  $JAK2^{V617F}$ . En ausencia de esta mutación se investiga el exón 12 del gen  $JAK2$ , solamente en caso de diagnóstico presuntivo de PV. En los restantes casos de NMPs luego de la búsqueda de la mutación  $JAK2^{V617F}$  se investigan las mutaciones en el gen  $CALR$  y en caso negativo las mutaciones del exón 10 del gen  $MPL$ . El estudio del rearreglo  $BCR-ABL1$  es de utilidad para excluir una LMC, especialmente en pacientes negativos para  $JAK2^{V617F}$  o que presentan características sugestivas de esta entidad, como basofilia, desviación a la izquierda en la fórmula leucocitaria o histología atípica en la MO. (Figura 3) (SAH, 2015).



**Figura 3.** Algoritmo del estudio molecular de NMPs *BCR-ABL1(-)*.

El análisis de la mutación del *JAK2* es mucho más prevalente que las alteraciones citogenéticas, por lo cual, es actualmente el *gold standard* para demostrar clonalidad y es uno de los criterios principales de diagnóstico.

### 1.9. Alteraciones citogenéticas en las NMPs *BCR-ABL1(-)*

Dado que estas entidades poseen aspectos clínicos y biológicos en común, lo cual dificulta su diagnóstico, los estudios citogenéticos y moleculares son herramientas de suma importancia para poder arribar a un diagnóstico certero.

En las NMPs *BCR-ABL1(-)*, las alteraciones citogenéticas al momento del diagnóstico se observan en muy bajo porcentaje, por lo tanto el estudio molecular es el estudio de elección. La mayoría de las aberraciones cromosómicas observadas están reportadas en los desórdenes mieloides pero no son específicos de un grupo en particular. Una característica constante de todo el grupo es la ausencia del cromosoma Philadelphia. En PV la incidencia de alteraciones citogenéticas al diagnóstico es del 15-25%. En los pacientes tratados este porcentaje se incrementa al 40%, especialmente en los que han



recibido drogas mielosupresoras respecto de los que han sido tratados con flebotomía. Las alteraciones mas comunes son: 20q-, +8, +9, +1q, 13q- (Bench et al, 2000), (Kralovics et al, 2002).

En TE las alteraciones cromosómicas se observan en menos del 10% de los casos y ninguna de ellas es específica, por lo tanto el estudio citogenético recae fundamentalmente en determinar ausencia del cromosoma Ph y excluir una leucemia mieloide crónica como la causa de la trombocitosis (Sessarego et al, 1989).

En MF las alteraciones citogenéticas se observan en 40-60% de los casos, las aberraciones cromosómicas son semejantes a las detectadas en PV. La del (13q) y del (20q) se observan en 20-25% de los casos con cariotipo anormal, en menor frecuencia se puede detectar +8 (15%), +9 (10%),+21 (5%) (Tefferi et al, 2001).

#### **1.10. Activación y vías de señalización de JAK2 en las NMPs *BCR-ABL1*(-)**

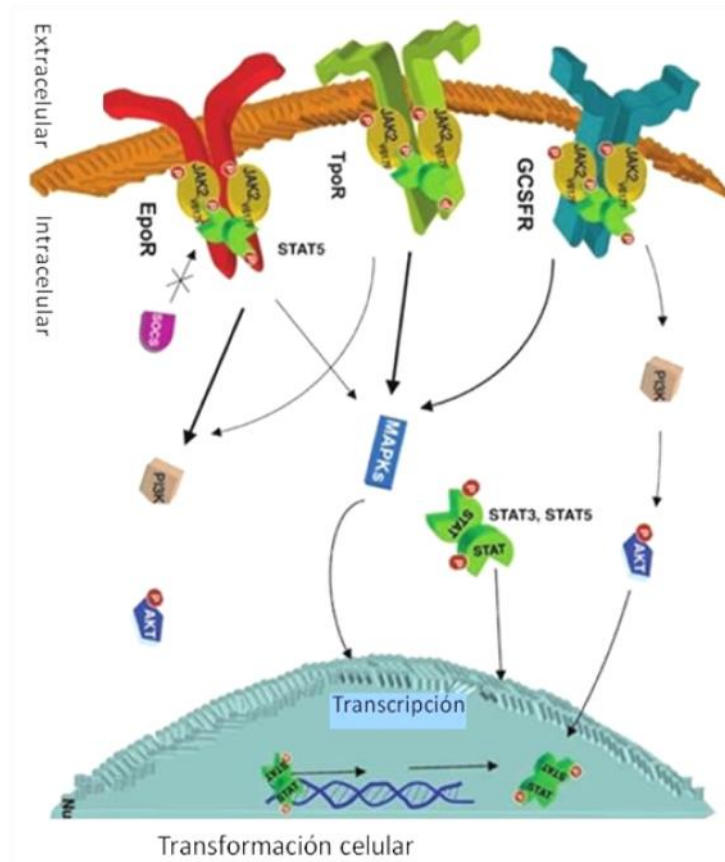
*JAK2* es un gen crucial para la señalización de las vías del receptor de eritropoyetina (EPOR) y de trombopoyetina (TPOR), además de intervenir en la vía de señalización del receptor del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSFR). Participa también en las vías de señalización de IL3/IL5, citoquinas de la familia de factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos. Teniendo en cuenta que las NMPs *BCR-ABL1* (-) afectan principalmente a los linajes eritroide, megacariocítico y de granulocitos, el complejo entre *JAK2*<sup>V617F</sup> con EPOR, TPOR y G-CSRF podría explicar la hipersensibilidad de citoquinas y su independencia en estas enfermedades (Kota et al, 2008). El receptor de trombopoyetina (EPOR) es un dímero preformado en la superficie celular, que después de su unión a citoquinas se somete a un cambio conformacional que desencadena la activación de *JAK2* cuando éste se une a la región citoplasmática de EPOR, lo que lleva a inducir la señalización independiente de eritropoyetina (EPO), posiblemente, mediante la fosforilación citosólica de residuos tirosina en EPOR, lo cual conduciría a una fuerte actividad de STAT5. La vía que involucra el EPOR, funciona activando

principalmente JAK2-STAT5 y PI3K/AKT (Figura 4). El EPOR es un activador débil de la vía MAP quinasa y STAT3, ya que no contiene un sitio de unión para STAT3, mientras que varios residuos de tirosina fosforilados (Y343, Y401, Y429 y Y431) se pueden unir a STAT5 que se requieren para su máxima activación. Una consecuencia de ello es la inducción de la proteína anti-apoptótica BCL-XL, que se expresa constitutivamente en progenitores eritroides de PV.

En cuanto al receptor de trombopoyetina (TPOR), se acopla y activa a JAK2 y TYK2, que parecen tener afinidades comparables por el receptor para promover el tráfico de la superficie celular, sin embargo, JAK2 es mucho más efectiva que TYK2 en la transducción de señales. TPOR activa a JAK2, STAT5 y PI3K/AKT, pero en contraste con EPOR, es un fuerte activador de MAP kinasas y de STAT3. Como consecuencia de la expresión de la mutación  $JAK2^{V617F}$ , se promueve la formación de plaquetas mediante activación de la vía de STAT3, mientras que la estimulación de progenitores eritroides es llevada a cabo por activación de STAT5. A niveles bajos de expresión de  $JAK2^{V617F}$  sólo se podría activar la vía STAT3, lo que sería suficiente para la formación de plaquetas, a mayores niveles de expresión el acoplamiento de TPOR y EPOR dará lugar a la activación de STAT5, lo que favorecerá a la diferenciación eritroide. No está claro aún, si el fenotipo de PV es exclusivamente el resultado de la activación de EPOR o si la activación patológica de TPOR también contribuye al fenotipo (Kota et al, 2008). Aparentemente la mutación  $JAK2^{V617F}$  puede afectar a la señalización de G-CSFR con menor eficiencia que para EPOR y TPOR, ésta es quizá la razón por la cual el linaje granulocítico se ve afectado en menor medida comparativamente con los linajes eritroide y megacariocítico, especialmente a bajos niveles de  $JAK2^{V617F}$ . La activación de los complejos de G-CSFR y  $JAK2^{V617F}$  puede dar lugar a recuentos elevados de granulocitos así como a interacciones plaquetarias, lo que contribuiría a complicaciones trombóticas. No está claro si la leucocitosis que se observa en determinados pacientes con NMPs *BCR-ABL1* (-) está asociado con ciertas complicaciones o con evolución a leucemia, tal vez podría deberse a la activación patológica de G-CSFR por  $JAK2^{V617F}$ . Al igual que TPOR, G-CSFR activa las vías STAT3 y MAP Kinasas, además de JAK2-STAT5 y PI3K/AKT. Se ha identificado para este receptor, un muy

delicado balance entre la activación de STAT3, requerido para la diferenciación y la inducción del cese del crecimiento celular, y STAT5, que promueve la proliferación.

La unión de SOCS3 a través de su dominio SH2 a un residuo tirosina fosforilado en el extremo citosólico del receptor, regula específicamente aguas abajo a la vía de señalización STAT5. La delección de la región citosólica que contiene el sitio de unión a SOCS3 conduce a un aumento en la relación STAT5/STAT3 y esto se asocia con evolución a leucemia mieloide aguda en pacientes con neutropenia congénita grave. La activación de G-CSFR podría tener efectos sinérgicos con otros mecanismos y promover la movilización de CD34+ y progenitores de la médula ósea a la periferia.



**Figura 4.** Modelo de señalización constitutiva de las vías que involucran los receptores de eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSFR). Es de esperar que EPOR y TPOR se unan a JAK2<sup>V617F</sup>, mientras que G-CSFR lo hace solo a altos niveles de JAK2<sup>V617F</sup>, por ejemplo en presencia de homocigosis de la mutación. La fosforilación constitutiva de JAK2<sup>V617F</sup> lleva a la activación de las vías STATs, MAP quinasa, PI-3-quinasa (PI3K) y Akt. Las proteínas SOCS se espera que actúen sobre complejos EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> llevando a una *down-*modulación de la actividad de JAK2. El complejo EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> parece escapar de la actividad de SOCS3 (Kota et al, 2008).

### 1.11. Terapias en NMPs *BCR-ABL1*(-)

Los objetivos del tratamiento en estos desordenes son disminuir la incidencia y recurrencia de trombosis y hemorragias, tratar las complicaciones trombóticas y hemorrágicas así como los factores de riesgo cardiovasculares, manejar las situaciones de riesgo (cirugía, embarazo), controlar los síntomas sistémicos y disminuir la incidencia de leucemia y MF post-PV y MF post-TE (SAH, 2015). En cuanto al tratamiento de la TE, como agente antiagregante se encuentra la *Aspirina* (Ácido Acetilsalicílico, AAS), el *INF*

(*Interferón*), fármaco citorreductor que inhibe progenitores de fibroblastos en la Médula ósea, suprime la proliferación de progenitores hematopoyéticos e inhibe la acción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Kiladjian et al, 2008). Hay suficiente evidencia de que *INF* logra con eficacia la inducción de la remisión hematológica (Hasselbach 2011, Silver et al, 2013) y una elevada respuesta molecular. La *Hidroxiurea (HU)*, es un tratamiento recomendado de primera línea en todos los pacientes (Harrison et al, 2010) y de pacientes de la tercera edad con TE (Barbni et al, 2011). Otro fármaco suministrado en este tipo de patologías es *Anagrelide (ANA)*, específico para la línea de megacariocitos, originalmente desarrollado como un agente anticoagulante que demostró tener un potente efecto reductor de plaquetas, no afecta a la proliferación de células progenitoras de glóbulos rojos o glóbulos blancos, reduce el tamaño de megacariocitos, ploidía y maduración (Hong y Erusalimsky 2002, Hong et al, 2006).

En cuanto a la PV y su tratamiento, las opciones terapéuticas son limitadas y las terapias disponibles (una dosis baja de *AAS*, *Flebotomía*, *HU*) son principalmente paliativas y con un enfoque en la prevención de la ocurrencia de trombosis y la mejora de los síntomas (Griesshammer et al, 2015). No hay una cura disponible, los tratamientos para PV se orientan a un hematocrito menor a 45 % ya que esto se ha asociado con una reducción en las muertes cardiovasculares y eventos trombóticos. Dosis bajas de *AAS* pueden ser utilizadas en combinación con flebotomía (lo que disminuye la hiperviscosidad de la sangre), además la terapia citorreductora como *HU* o *INFa* (tratamientos de primera línea), se recomienda para pacientes con alto riesgo de complicaciones vasculares. Para aquellos pacientes que con el tiempo puedan generar resistencia o intolerancia a *HU*, existen otras terapias citorreductoras de segunda línea. Sin embargo, sólo se reservan para pacientes de edad avanzada o para aquellos con enfermedad en progreso en quienes el riesgo de trombosis es mayor que el riesgo de transformación a leucemia, dado su potente efecto leucemogénico.

El descubrimiento de *JAK2<sup>V617F</sup>* ha impulsado el desarrollo de inhibidores de la mutación con distintas especificidades y funciones, biológicas y clínicas. Varios compuestos que difieren en estructura y selectividad de *JAK* se encuentran en diferentes

etapas de desarrollo clínico. Teniendo en cuenta la activación no regulada de *JAK2* como un potencial mecanismo causal de las NMPs *BCR-ABL1* (-) se comenzaron a desarrollar inhibidores de *JAK2*, los cuales han demostrado ser efectivos en estudios preclínicos llevados a cabo en modelos de neoplasias mieloproliferativas (Quintas-Cardama et al, 2010). Estos nuevos fármacos reducen selectivamente la fosforilación de la vía JAK-STAT, la proliferación celular y sobrevida de células activadas por *JAK2* tanto *in vitro* (líneas celulares *JAK2+*) como *in vivo* (modelo murino *JAK2+*) (Hitoshi et al, 2010).

El primer fármaco en ser aprobado para el tratamiento de pacientes con MF de moderado o alto riesgo, es el *Ruxolitinib*, ya que ha demostrado inducir efectos importantes sobre la esplenomegalia, síntomas relacionados con la inflamación y la calidad de vida pero menores efectos en la sobrevida. Las principales limitaciones y efectos secundarios fueron la anemia y la trombocitopenia, además de la mielotoxicidad especialmente del linaje megacariocítico, lo cual limita significativamente la población de pacientes que puede beneficiarse con este agente. En 2010 la primera fase I/II de prueba fue realizado con *Ruxolitinib*, posteriormente dos estudios aleatorizados se llevaron a cabo mediante ensayos de fase III comparando *Ruxolitinib* con el placebo y la mejor terapia disponible en pacientes con MF, COMFORT-I (*Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment*) y COMFORT-II respectivamente (Harrison et al 2012, Verstovsek et al 2012). Ambos estudios han demostrado significativos beneficios clínicos, a pesar de algunos efectos adversos, que pudieron ser controlados variando las dosis administradas.

Una actividad inhibidora más selectiva que *Ruxolitinib*, la muestra *Fedratinib*, una pequeña molécula que también ha demostrado eficacia en el tratamiento de pacientes con MF. Un ensayo de fase I/II en pacientes de riesgo moderado o alto de MF o MF-Post-PV o Post-TE, demostró eficacia de este agente en la reducción de esplenomegalia, normalización del recuento de leucocitos y una significativa disminución de la carga alélica en algunos pacientes. Los principales efectos adversos fueron diarrea (10%), más a menudo trombocitopenia (24%) y anemia (35%) (Deuberme et al, 2015). Debido a la necesidad de intentar limitar la mielotoxicidad en el tratamiento de la MF, surgió

*Pacritinib* (anteriormente conocida como SB1518), un inhibidor de las tirosinas quinasas JAK2 y JAK3, como resultado de la inhibición de las vías STAT3 y STAT5, la señalización de líneas celulares dependientes de *JAK2* de pacientes tratados con *Pacritinib*, pueden sufrir la detención del ciclo celular en la fase G1 y someterse a apoptosis (Hart et al, 2011). Este fármaco ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase temprana con mielotoxicidad limitada y respuestas clínicas que son comparables con las observadas para *Ruxolitinib*, incluso en pacientes con trombocitopenia severa. Actualmente existen dos grandes ensayos clínicos de fase III de *Pacritinib* en MF, incluyendo pacientes con trombocitopenia y aquellos tratados con *Ruxolitinib*, si los resultados alentadores que se observan en los ensayos clínicos de fase temprana se confirman, puede el *Pacritinib* representar una nueva opción de tratamiento para pacientes con MF y en particular con citopenias significativas (Duenas-Perez and Mead, 2015).

Otro de los potentes inhibidores es el *Momelotinib*, inhibe a JAK1, JAK2 y TYK2, y actualmente está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase III con resultados preliminares de fase I/II que muestran respuestas favorables en el bazo y en la anemia (Gupta et al, 2014). Las estructuras químicas de *Pacritinib*, *Ruxolitinib*, *Fedratinib* y *Momelotinib* son bastante diferentes, lo que podría disminuir la probabilidad de efectos secundarios neurológicos no deseados que se han observado con otros agentes (Zhang et al, 2014). La única opción curativa para pacientes con MF es el trasplante alogénico de médula ósea, pero las altas tasas de morbilidad y mortalidad hacen a este tratamiento inadecuado para la mayoría de los pacientes.

## ***2. OBJETIVOS***



## 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia de la determinación de la mutación  $JAK2^{V617F}$  y su carga alélica en las NMPs  $BCR-ABL1$  (-), se proponen los siguientes objetivos:

- Evaluar la carga alélica del gen  $JAK2^{V617F}$  en las diferentes NMPs  $BCR-ABL1$  (-): PV, TE y MF a fin de establecer correlaciones genotipo – fenotipo.
- Estudiar el nivel de expresión de la mutación  $JAK2^{V617F}$  a fin de inferir mecanismos de sobre o subexpresión del gen mutado.
- Correlacionar los valores de carga alélica de la mutación  $JAK2^{V617F}$  con parámetros clínicos.

### ***3. MATERIALES Y METODOS***

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Población estudiada

Se estudiaron 41 pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR-ABL1* negativas NMPs *BCR-ABL1* (-), 21 con policitemia vera (PV), 11 con trombocitemia esencial (TE) y 9 con mielofribosis primaria (MF) (tabla 1). Como población control fueron evaluados 20 individuos sanos. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina de Bs. As (CEIANM) y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente

Tabla 1. Características de pacientes con NMPs *BCR-ABL1* (-)

	PV (n= 21)	TE (n=11)	MF (n= 9)
Varones/Mujeres	8/13	4/7	2/7
Edad(promedio,años)	63	55,7	63,4
Rango de edad (años)	23 - 90	19 – 95	46 - 86
<u>Caract. al Dx:</u>	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$
Hematocrito (%)	48,3 ± 8,0	41,7 ± 3,7	34,2 ± 3,1
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	10,6 ± 6,5	8,1 ± 2,5	8,3 ± 4,4
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	438,1 ± 278,2	727,8 ± 288,9	201,6 ± 121,9
Esplenomegalia	12/21	3/11	7/9
Hepatomegalia	5/21	2/11	0/9
Ptes en tto citordtivo	17/21	6/11	6/9

### 3.2. Lisis celular

Las muestras de sangre periférica (SP) de pacientes y controles anticoaguladas con EDTA al 5%, se sometieron al protocolo de lisis de glóbulos rojos con buffer de bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01 M) y cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144 M) en agua deionizada; la lisis fue realizada durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g durante 10 minutos. Cada muestra fue lavada hasta obtener un pellet de glóbulos blancos limpio.

### 3.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de leucocitos totales de SP empleando el método del *DNAzol* (Invitrogen *LifeTechnology*).

Los glóbulos blancos se resuspendieron en 1 ml de *DNAzol* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%, se agitó enérgicamente y se dejó reposar por 2-3 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 800  $\mu\text{l}$  de etanol 75%, se agitó y se dejó reposar por 2-3 minutos repitiendo dos veces este procedimiento. El pellet obtenido se resuspendió en 100-300  $\mu\text{l}$  de NaOH 8mM. Finalmente, se estimó la concentración de ADN genómico obtenido por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV). La pureza de los ácidos nucleicos relativa a proteínas se estimó a través de la relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  (la pureza es óptima cuando la relación es igual o mayor a 1,8). La cuantificación del ADN obtenido se realizó sabiendo que: 1 unidad  $\text{DO}_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g}$  ADN/ml. La calidad del ADN fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.4. Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó a partir de leucocitos totales de SP utilizando el método del *trizol* (Invitrogen *LifeTechnology*). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se resuspendieron en 1 ml de *trizol* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó enérgicamente y se dejó reposar por 2-3 minutos seguido de una primera centrifugación a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN obtenido se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se dejó secar a 65°C durante 5 minutos y fue resuspendido en 30-50  $\mu$ l de agua bidestilada estéril pre-tratada con DEPC al 0,1%. La concentración de ARN se estimó por espectrofotometría a 260 nm, y la pureza se determinó a través de las absorbancias a las longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm (las relaciones  $DO_{260}/DO_{230} < 1$  son indicativas de contaminación con solventes orgánicos (fenol); relaciones  $DO_{260}/DO_{280} < 1,9$  son indicativas de contaminación con proteínas); una relación  $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,9$  indica que la muestra está pura y se calcula la concentración del ARN sabiendo que una unidad  $DO_{260}$  equivale a 40  $\mu$ g ARN/ml.

### 3.5. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se realizó mediante RT-PCR en un volumen final de 20  $\mu$ l empleando 2  $\mu$ g de ARN total. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 65°C durante 10 minutos, la retrotranscripción a 37°C por 60 minutos y finalmente la inactivación de la enzima transcriptasa reversa a 72°C durante 15 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los siguientes reactivos: 5X *Reaction buffer* (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM  $MgCl_2$  y 10mM DTT), 10 mM de cada dNTPs (desoxiribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP, dCTP), *randomprimers* 250

ng/ $\mu$ l, Rnase-out (40 U/ $\mu$ l) y 10 U de M-MLV Transcriptasa Reversa (Promega, Madison, WI, USA).

### 3.6. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) se realizó empleando el LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), basado en la metodología del sistema SYBR-Green. Todas las mediciones se realizaron en un volumen total de 20  $\mu$ l de mezcla de reacción conteniendo: 5  $\mu$ l de ADNc o 20 ng de ADN, 1X PCR Mix (LC FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics, Argentina), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,5  $\mu$ M de cada *primer*.

Las condiciones de reacción óptimas para la amplificación de *JAK2*<sup>V617F</sup> y *JAK2*<sup>WT</sup>, empleando ADN como sustrato fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min seguido por 45 ciclos de 3 segmentos de PCR (95°C por 5 seg, 62°C por 6 seg, 72°C por 12 seg).

Las condiciones empleadas para la amplificación de *JAK2*<sup>V617F</sup> y *JAK2*<sup>WT</sup> utilizando ADNc como sustrato se detallan a continuación: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min seguido por 50 ciclos de un segmento que contiene 4 pasos de PCR (95°C por 5 seg, 58°C por 3 seg, 72°C por 20 seg y 75°C 1 seg). Los *primers* alelo específicos empleados en este estudio para la cuantificación relativa de *JAK2*<sup>V617F</sup> y *JAK2*<sup>WT</sup> a partir de muestras de ADNc o ADNg son los publicados por Vannucchi et al (2006) y Gonzalez et al (2014), respectivamente (Tabla 2).

Las curvas de calibración necesarias para la cuantificación fueron realizadas a partir de diluciones seriadas de los plásmidos de referencia ADNg o ADNc *JAK2*<sup>V617F</sup>:*JAK2*<sup>WT</sup> 1:1, (Gonzalez et al, 2014), con el fin de estimar las eficiencias de amplificación y cuantificar la carga alélica y nivel de transcritos *JAK2*<sup>V617F</sup> y *JAK2*<sup>WT</sup> dentro del rango dinámico.

**Tabla 2.** Secuencias de primers empleados para la cuantificación por PCR cuantitativa.

<i>Primers alelo específicos para ADNc</i>		
FO-1	ATTTTTAAAGGCGTACGAAGAGAAGTAG	Vannucchi et al, 2006.
RO-1	ATAAGCAGAATATTTTTGGCACATACAT	Vannucchi et al, 2006.
RI-1	ACCAGAATATTCTCGTCTCCACAaAA	Vannucchi et al, 2006.
FI-1	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG	Vannucchi et al, 2006.
<i>Primers alelo específicos para ADNg</i>		
Fwt	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG	Jones et al, 2005.
ROin	ATTGCTTTCCTTTTCAACAAGAT	Jones et al, 2005.
FOnew	CATATAAAGGGACCAAAGCACA	Gonzalez et al, 2014.
RMTnew	TACTTACTCTCGTCTCCACAAAA	Gonzalez, 2014.

### 3.7. Cálculo de carga alélica

La carga alélica (CAL) fue calculada empleando la fórmula  $MT / (MT+WT)$ , donde MT representa la cantidad de alelo mutado (c.1849G>T) y WT, el alelo salvaje (*wildtype*), ambos en unidades relacionadas a las diluciones del constructo de referencia MT:WT 1:1 usadas para elaborar las curvas de calibración, (Gonzalez et al, 2014).

### 3.8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente empleando el *test t de Student* (para variables cuantitativas). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## ***4. RESULTADOS***

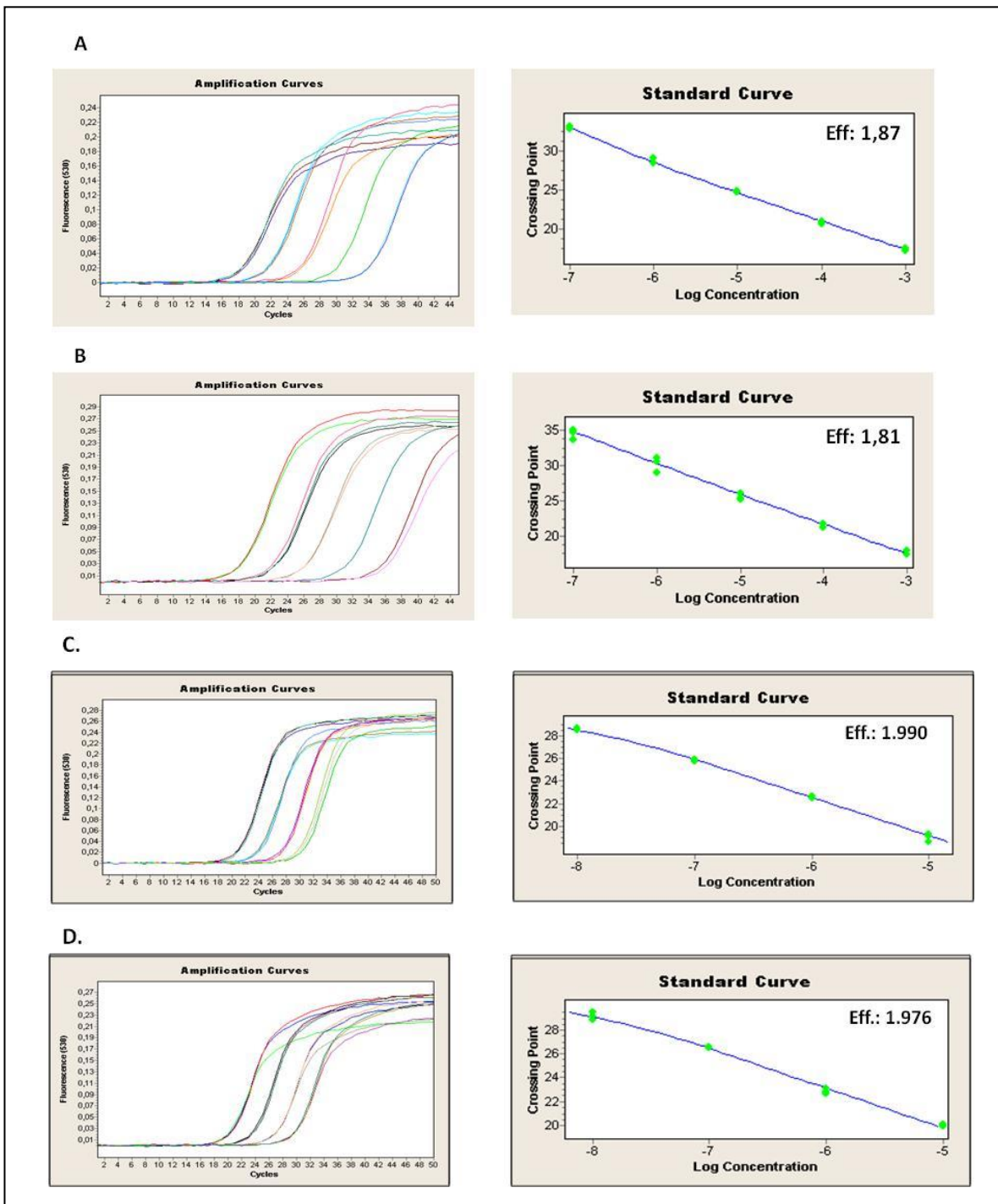


## 4. RESULTADOS

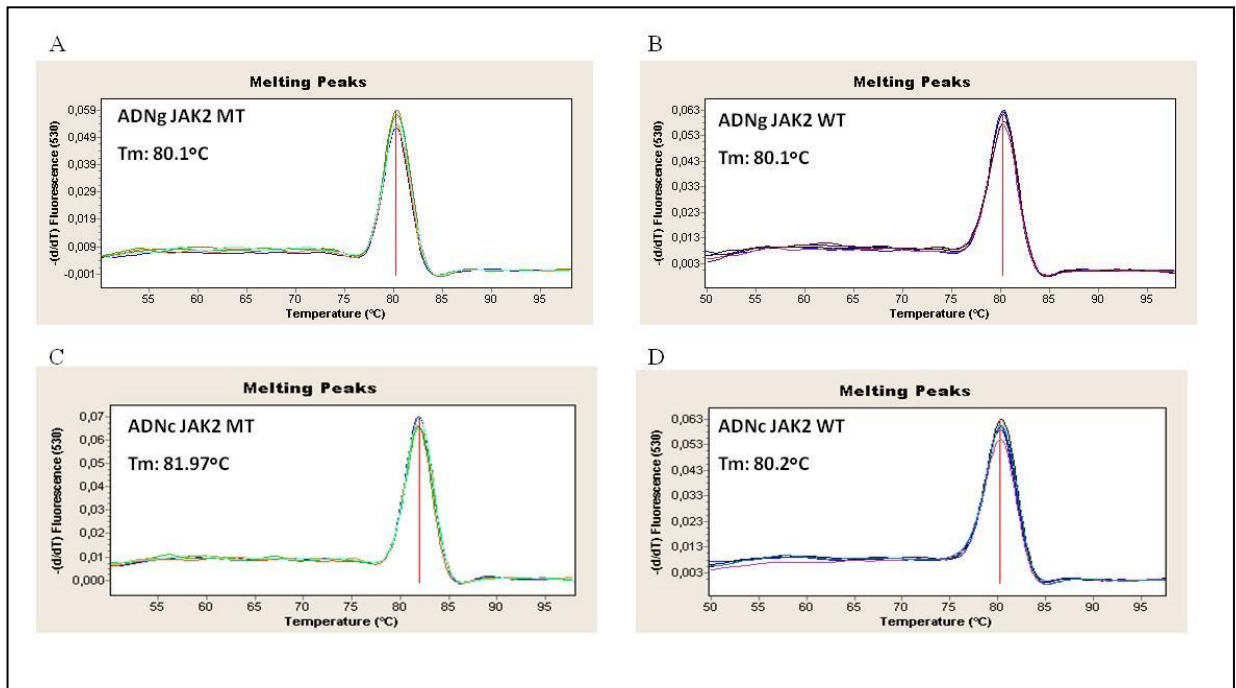
### 4.1. Determinación del rango dinámico para la cuantificación de la carga alélica de la mutación V617F

Para determinar el rango dinámico (rango de medición confiable) de ADNg y ADNc que permite la cuantificación mediante PCR en tiempo real, se realizaron curvas de calibración a partir de diluciones seriadas (1:10) de los plásmidos de referencia ADNg *JAK2* 1:1 MT: WT y ADNc *JAK2* 1:1 MT: WT (Gonzalez et al, 2014). (Figura 5).

Asimismo, la especificidad de los productos obtenidos en las amplificaciones QPCR fue investigada mediante el análisis de las curvas de desnaturalización de los productos obtenidos en cada caso (*melting curves*) (Figura 6).

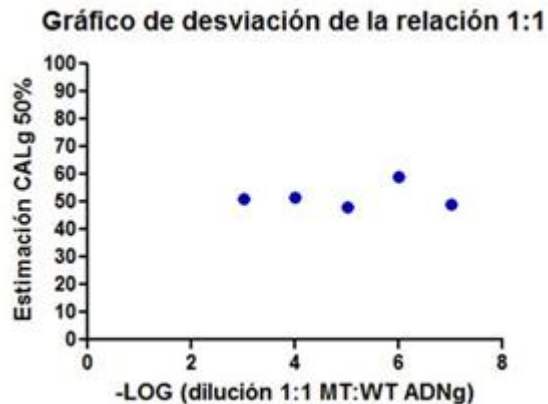


**Figura 5.** Curvas de calibración para el análisis de expresión del alelo mutado (MT)  $JAK2^{V617F}$  y del alelo salvaje (WT)  $JAK2^{WT}$ . En el panel izquierdo se muestran las curvas de amplificación PCR en tiempo real (intensidad de fluorescencia medida en cada ciclo) y en el panel derecho se muestran los gráficos correspondientes al Cp (*Crossing point*) vs el Log de la concentración del plásmido (en UA: unidades arbitrarias asociadas con una dilución específica del mismo plásmido). Las mediciones QPCR se realizan por triplicado. (A) Cuantificación del alelo mutado (MT) y (B) del alelo normal, correspondientes al constructo ADNg MT: WT 1:1. (C) cuantificación del alelo mutado (MT) y (D) del alelo normal, correspondientes al constructo ADNc MT: WT 1:1. Eff: indica la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (Eff = 2, indica amplificación óptima).



**Figura 6.** Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de los productos de amplificación QPCR MT y WT para ADNg y ADNc. Se identifica la  $T_m$  como un pico único bien definido característico de cada producto amplificado (línea vertical). (A) Alelo mutado (MT) y (B) alelo salvaje (WT) obtenido a partir de ADNg. (C) Alelo MT y (D) alelo WT obtenido a partir de ADNc.

Para estudiar la capacidad de los plásmidos de referencia ADNg y ADNc para determinar con precisión la carga alélica (CALg) y nivel de expresión (CALc) de la mutación  $JAK2^{V617F}$  correspondiente al 50%, se definió un rango dinámico como el rango de dilución del plásmido de referencia en el cual las fluctuaciones en el 50% fueron mínimas. En el rango de diluciones de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  para el plásmido ADNg se obtuvo un promedio de 52,53% y un desvío estándar de 4,2% (Figura 7), (Gonzalez et al, 2014). Por lo tanto utilizando estos standards se considera que un paciente presenta pérdida de heterocigosidad (LOH), indicando homocigosidad de la mutación, cuando los valores de carga alélica superan el valor 56,7% ( $\bar{X} \pm SD$ :  $52,5 \pm 4,2$ ).



**Figura 7.** Gráfico de desviación de la relación 1:1 en el rango dinámico de diluciones de los plásmidos de referencia. CALg medida para cada dilución del plásmido ADNg (Gonzalez et al, 2014).

#### **4.2. Cuantificación de carga alélica y expresión de $JAK2^{V617F}$ en pacientes con NMPs $BCR-ABL1$ (-)**

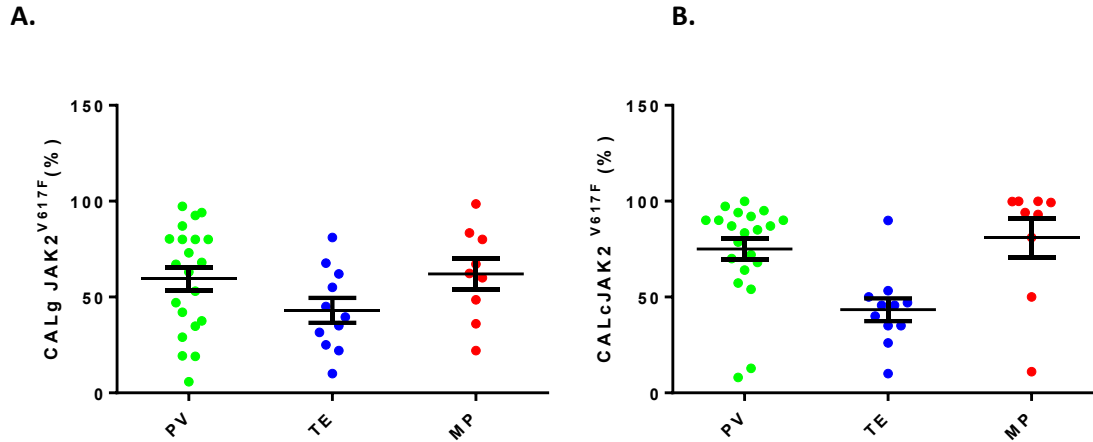
Los resultados obtenidos de carga alélica a nivel genómico (ADN) y transcripcional (ARN) mediante QPCR se detallan en la tabla N°3 y en la figura N° 8 A y B respectivamente. Dichos resultados fueron obtenidos mediante QPCR en 41 pacientes con NMPs  $BCR-ABL1$  (-), (21 PV, 11 TE y 9 MF). Si se comparan los valores puede observarse un incremento de la carga alélica en pacientes con MF (media  $\pm$  ES) (62,01 $\pm$ 8,00), y PV (59,51 $\pm$ 6,01) respecto de TE (43,08 $\pm$ 6,49). El *cut off* para que una muestra sea considerada positiva para la mutación  $JAK2^{V617F}$  mediante QPCR es de 3,65 %, teniendo en cuenta el valor promedio (1,04%) más 2SD (2x1,3) obtenido en una población control de 20 individuos sanos (Gonzalez et al, 2014).

Tabla 3. Valores de carga alélica y expresión de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>

Nºcaso	NMP	JAK2V617F CAL g (%)	JAK2V617F CAL c (%)	CALc/CALg
1	PV	34,8	99,9	<b>2,87</b>
2	PV	92,6	83,4	0,90
3	PV	53,08	57,3	1,07
4	PV	19,3	12,8	0,60
5	PV	97,27	97,3	1,00
6	PV	80,3	78,6	0,97
7	PV	29	90	<b>3,10</b>
8	PV	68	92	1,35
9	PV	87	90	1,03
10	PV	80	90	1,12
11	PV	63	87	1,38
12	PV	5,8	8,0	1,37
13	PV	80	95	1,18
14	PV	73	94	1,28
15	PV	37,5	54	1,44
16	PV	47	85	1,80
17	PV	42	72	1,71
18	PV	19	64	<b>3,36</b>
19	PV	67	68	1,01
20	PV	94	87	0,92
21	PV	80	70	0,87
1	TE	35	40	1,14

2	TE	10	10	1,00
3	TE	25	35	1,40
4	TE	22	26	1,18
5	TE	55	50	0,90
6	TE	62	47	0,75
7	TE	39,5	45,7	1,15
8	TE	67,7	45,7	0,67
9	TE	45,1	53,3	1,18
10	TE	31,5	35,02	1,11
11	TE	81,1	89,9	1,10
1	MF	62,3	94,1	1,51
2	MF	60,1	99,9	1,66
3	MF	98,6	99,8	1,01
4	MF	67,18	99,3	1,47
5	MF	83,4	99,9	1,19
6	MF	36	50	1,38
7	MF	22	11	0,50
8	MF	48,5	81	1,67
9	MF	80	93	1,16
<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>				<b>1,30 <math>\pm</math> 0,59</b>
<b><math>\bar{X} \pm 2SD</math></b>				<b>1,30 <math>\pm</math> 1.18</b>

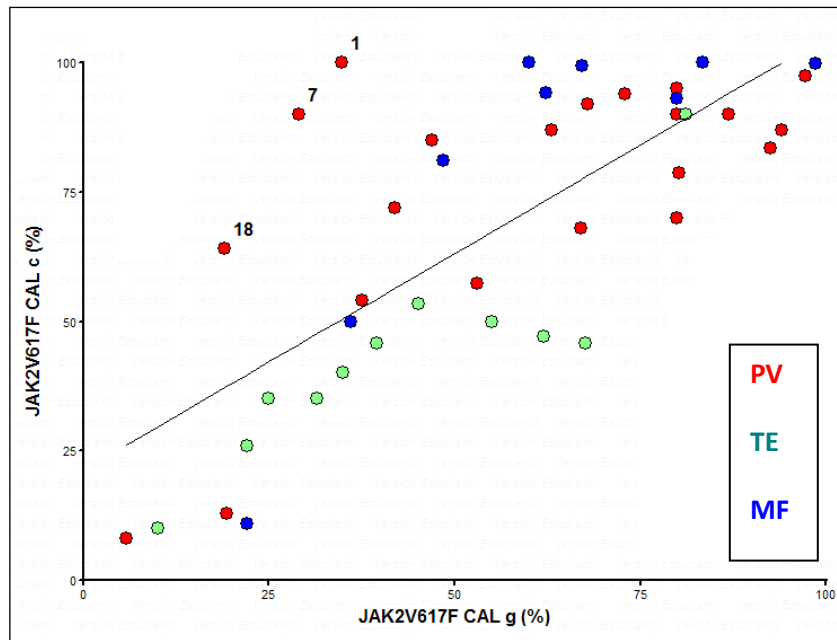
Los casos coloreados son los que muestran sobreexpresión. *Cut off*: 2,48



**Figura 8.** Carga alélica y nivel de expresión de la mutación  $JAK2^{V617F}$  en NMPs  $BCR-ABL1(-)$ . **A.** Determinación de la carga alélica (CALg) de la mutación  $JAK2^{V617F}$  mediante QPCR. **B.** Determinación del nivel de expresión (CALc) de la mutación  $JAK2^{V617F}$  mediante QPCR.

### 4.3. Carga alélica a nivel genómico y transcripcional de la mutación $JAK2^{V617F}$

Los experimentos de comparación de niveles de  $JAK2^{V617F}$  en muestras pareadas de ADN y ARN de los pacientes indicaron una correlación estadísticamente significativa (Spearman  $r=0,7$ ,  $p<0,0001$ ) (tabla 3) (figura 9). Se observó que sólo 3 casos con diagnóstico de PV presentaban valores muy incrementados de transcritos  $JAK2^{V617F}$ , considerados *outliers*, lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación, tal situación se evidencia mejor al calcular el índice entre CALc/CALg (tabla 3). Esta relación permitió calcular un *cut off* a partir del cual se puede fácilmente individualizar los casos con aumento en la expresión de la mutación respecto de su carga alélica. Este *Cut off* se calculó teniendo en cuenta el valor promedio de las relaciones CALc/CALg de toda la población ( $\bar{X}$ : 1,30) más 2SD ( $2 \times 0,59$ ) dando un valor de 2,48. Teniendo en cuenta este valor se individualizaron los casos 1, 7 y 18 con PV, los cuales presentaban un aumento de la expresión de la mutación  $JAK2^{V617F}$ .



**Figura 9.** Análisis de correlación entre los resultados de QPCR empleando ADNg y ADNc como sustrato. Se observa una correlación significativa entre la carga alélica y los niveles de expresión de la mutación  $JAK2^{V617F}$  (Spearman  $r=0,7$ ,  $P<0,0001$ ).

#### 4.4. Pérdida de heterocigosidad (LOH) de la mutación $JAK2^{V617F}$

Teniendo en cuenta los valores de carga alélica de la mutación  $JAK2^{V617F}$  se pudo estimar la frecuencia de LOH en las diferentes NMPs  $BCR-ABL1(-)$ . Para que una muestra sea considerada homocigota para la mutación  $JAK2^{V617F}$ , debe arrojar valores de carga alélica superiores a 56,7% considerando el rango dinámico de las diluciones de los plásmidos de referencia (Gonzalez et al, 2014). El porcentaje de casos con LOH fue de 66,6% (6/9), 57% (12/21) y 27% (3/11) para MF, PV y TE respectivamente, mostrando que la TE posee menor incidencia de homocigosis para la mutación  $JAK2^{V617F}$ .



#### 4.5. Análisis comparativo de parámetros hematológicos en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>

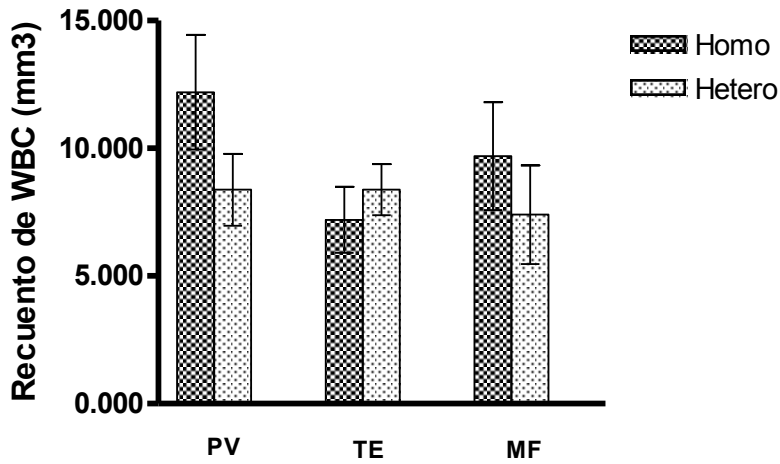
Se compararon distintos parámetros hematológicos (Tabla 4); glóbulos blancos (WBC) (figura 10.A) hematocrito (HTO) (figura 10.B) y recuento plaquetario (PLT) (figura 10.C) en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en las diferentes NMPs *BCR-ABL1*(-) estudiadas. Se observó un aumento estadísticamente significativo en el recuento de plaquetas y una tendencia al incremento de WBC en pacientes con PV con homocigosis para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>. EN MF y TE no se observaron diferencias.

Tabla 4. Valores de glóbulos blancos, hematocrito y plaquetas en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>

NMP	WBC/mm <sup>3</sup>		HEMATOCRITO %		PLAQUETAS/mm <sup>3</sup>	
	HOMOC	HETER	HOMOC	HETER	HOMOC	HETER
PV	6.000	10.500	45	60	265.000	420.000
PV	6.100	6.900	38,1	53,2	720.000	408.000
PV	18.600	7.800	60,1	47	700.000	244.000
PV	7.000	5.900	59	39	300.000	201.000
PV	12.750	4.000	59	47,1	537.000	220.000
PV	5.300	11.100	39	44,5	343.000	301.000
PV	28.000	7.300	50	46	1.330.000	524.000
PV	15.700	4.300	46	40,9	428.000	304.000
PV	9.400	17600	37	61	347.000	52.100
PV	23.400	--	54	--	296.000	--

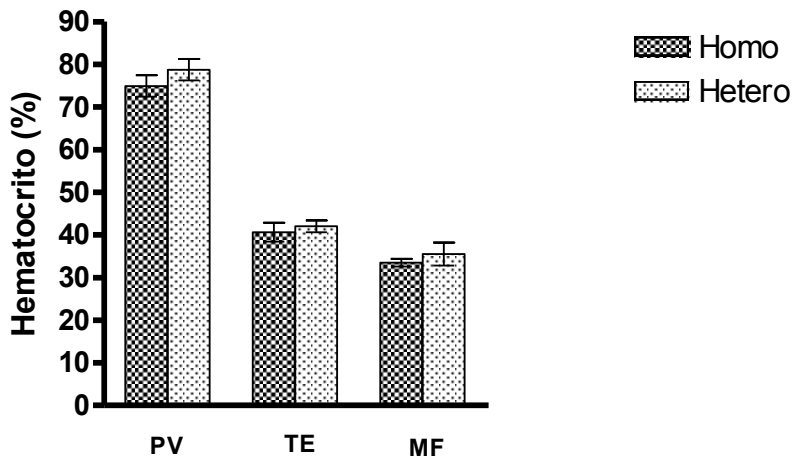
PV	7.300	--	47	--	851.000	--
PV	6.800	--	41,2	--	403.000	--
$\bar{X}_{PV} \pm ES_{PV}$	<b>12.195±</b> <b>2.243</b>	<b>8.377±</b> <b>1.407</b>	<b>47,9±</b> <b>2,5</b>	<b>48,74±</b> <b>2,5</b>	<b>543.333±</b> <b>92.108</b>	<b>297.122±</b> <b>46.692</b>
TE	7.200	5.700	45	40	833.000	576.000
TE	5.000	6.300	38,9	45	380.000	324.000
TE	9.400	9.500	38	42	1.149.000	902.000
TE	--	6.900	--	42,1	--	342.000
TE	--	10.700	--	50	--	800.000
TE	--	5.130	--	38	--	790.000
TE	--	10.800	--	40	--	800.000
TE	--	12.000	--	39,4	--	1.110.000
$\bar{X}_{TE} \pm ES_{TE}$	<b>7.200±</b> <b>1294</b>	<b>8378±</b> <b>953</b>	<b>40,63±</b> <b>2,2</b>	<b>42±</b> <b>1,36</b>	<b>787.333±</b> <b>227.369</b>	<b>705.500±</b> <b>96.806</b>
MF	4.970	8.500	35	33,4	265.000	110.000
MF	17.400	3.700	33	40,9	432.000	230.000
MF	11.800	10.000	35	32,3	160.000	50.000
MF	7.600	--	30	--	91.000	--
MF	6.600	--	32	--	157.000	--
MF	3.800	--	36	--	319.000	--
$\bar{X}_{MF} \pm ES_{MF}$	<b>8.695±</b> <b>2.115</b>	<b>7.400±</b> <b>1935</b>	<b>33,5±</b> <b>0,92</b>	<b>35,5±</b> <b>2,7</b>	<b>237.333±</b> <b>51573</b>	<b>130.000±</b> <b>53.912</b>

A.



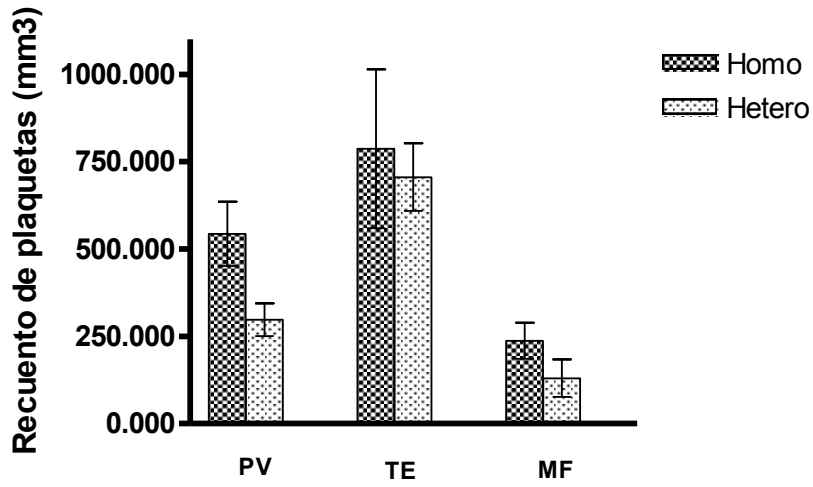
**Figura 10.A):** Recuento de WBC en PV, TE y MF, teniendo en cuenta la LOH de la mutación  $JAK2^{V617F}$ . Si bien la diferencia no es significativa, se observó una tendencia al aumento de WBC solo en PV.  $P < 0.09$  (test de t, 1 cola).

B.



**Figura 10.B):** Hematocrito en PV, TE y MF, teniendo en cuenta la LOH de la mutación  $JAK2^{V617F}$ . No se observaron diferencias significativas entre los casos con homo u heterocigosidad de la mutación.

c.



**Figura 10.C):** Recuento de plaquetas en PV, TE y MF teniendo en cuenta la LOH de la mutacion  $JAK2^{V617F}$ . Se observó un incremento significativo ( $P < 0,043$  test de t de 2 colas o  $P < 0,02$  test de t de una cola) en los pacientes con PV y homocigosis de la mutacion  $JAK2^{V617F}$ .

## ***5. DISCUSSION***

## 5. DISCUSION

Las NMPs *BCR-ABL1(-)* son un grupo heterogéneo de patologías hematológicas clonales que afectan tanto a la stem cell como a los precursores de los linajes eritroide, plaquetario o granulocítico causando mieloproliferación de una o más estirpes celulares. Dichas patologías se caracterizan genéticamente por la presencia de una mutación somática en el exón 14 del gen *JAK2*, denominada *JAK2<sup>V617F</sup>*. Esta mutación se identificó en el año 2005 simultáneamente en varios laboratorios de investigación (Kralovicks et al, 2005), (Baxter et al, 2005), (James et al, 2005), (Levine et al, 2005), (Zhao et al, 2005), detectándose en casi todos los casos de PV y en aproximadamente la mitad de los casos con TE y MF. La mutación consiste en una transversión G por T (1849>T), resultando en un cambio de valina por fenilalanina en la posición aminoacídica 617 (*V617F*) de la tirosina quinasa citoplasmática *JAK2*. Dicha mutación se ubica en el dominio pseudoquinasa JH2, cuya función es inhibir la actividad quinasa de *JAK2*. Como resultado, la proteína *JAK2* permanece constitutivamente fosforilada activando distintas vías de señalización como JAK/STAT, MAPK y PI-3K/Akt.

Luego de adquirida la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>*, puede producirse un fenómeno denominado pérdida de heterocigosidad (LOH). Estos eventos llevan a la homocigosidad de la mutación, introduciéndose el concepto de carga alélica (CAL), la cual se evalúa realizando la relación porcentual entre la cantidad de ADN de *JAK2* mutado respecto del total de ADN de *JAK2* (mutado + no mutado). Cuando este cálculo arroja valores superiores al valor teórico del 50% se infiere presencia de homocigosidad de la mutación. En este trabajo se evaluó la carga alélica del gen *JAK2<sup>V617F</sup>* en las diferentes NMPs *BCR-ABL1(-)*: PV, TE y MF a nivel genómico (ADNg) y transcripcional (ADNc). Para la determinación de la carga alélica de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* y el nivel de expresión de la misma se empleó la metodología de PCR cuantitativa en tiempo real. Es muy importante utilizar estándares apropiados para realizar las curvas de calibración necesarias para llevar a cabo la determinación por QPCR (Gonzalez et al, 2014), ya que la aparición de

discrepancias en la carga del alelo mutado podría ser en parte dependiente de la estrategia empleada en la cuantificación.

Los resultados de carga alélica a nivel genómico (ADN) y transcripcional (ARN) en MF (media  $\pm$  ES): (62,01 $\pm$ 8,00), (80,89 $\pm$ 10,26), en PV (59,51 $\pm$ 6,01), (75,02 $\pm$ 5,48) y en TE (43,08 $\pm$ 6,49), (43,42 $\pm$ 5,95) respectivamente, muestran que la TE es la patología que presenta menor carga coincidente con datos reportados en la literatura (Vannucchi et al, 2008).

La comparación de los niveles de carga alélica y de expresión de *JAK2*<sup>V617F</sup> en las patologías estudiadas mostraron una correlación significativa (Spearman  $r=0,7$ ,  $p<0,0001$ ), a pesar de la presencia de 3 casos con PV que presentaron niveles incrementados de transcritos *JAK2*<sup>V617F</sup> respecto de la carga alélica del mismo paciente. Los altos niveles de transcritos detectados en estos 3 casos podrían asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación.

En nuestra experiencia teniendo en cuenta el rango dinámico de la curva standard utilizando los constructos diseñados por Gonzalez et al (2014), la presencia de homocigosidad se infiere a partir de una carga alélica de 56,7% (ver resultados). La literatura muestra que los casos con mayores porcentajes de carga alélica, indicando LOH, se asocian con enfermedad de larga evolución, gran esplenomegalia, tratamiento con terapias citorreductoras, mayor probabilidad de complicaciones tales como trombosis, mielofibrosis y riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda.

Estudiando la carga alélica (CALg) de los 41 pacientes analizados se detectó un 51,2% (21/41) de casos con CALg  $\geq$  56,7%. Si lo discriminamos por patología observamos que la presencia de homocigosis de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> fue de 66,6% (6/9) en MF, 57% (12/21) en PV y 27% (3/11) en TE, lo cual muestra que el fenómeno de homocigosidad de la mutación se observó con mayor frecuencia en pacientes con MF y PV comparado con TE, coincidentemente con los datos publicados en la literatura (Vannucchi et al, 2008), (Birgegard, 2015).

A fin de correlacionar los valores de carga alélica de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> con parámetros clínicos, en este trabajo se realizó el análisis de glóbulos blancos (WBC),

hematocrito y recuento de plaquetas en pacientes homocigotas y heterocigotas para la mutación  $JAK2^{V617F}$ . Si bien el número de casos analizados es reducido, para poder sacar conclusiones, el análisis estadístico mostró un incremento significativo en el recuento de plaquetas y una tendencia al aumento de WBC en pacientes con PV con homocigosis de la mutación  $JAK2^{V617F}$ . En cuanto a TE y MF, no se observaron diferencias entre pacientes homocigotas y heterocigotas en ninguno de los tres parámetros clínicos analizados. Nuestros resultados apoyan los datos de la bibliografía en cuanto a que en la TE la formación de plaquetas es independiente de los niveles de carga alélica de la mutación  $JAK2^{V617F}$ , mientras que a mayores niveles de  $JAK2^{V617F}$  e interacción con EPOR se estimularía la diferenciación eritroide, por lo que el hematocrito estaría aumentado en PV (Kota et al, 2008).

La mutación  $JAK2^{V617F}$  afectaría a la señalización de G-CSFR con menor eficiencia que a los receptores de eritropoyetina (EPOR) y trombopoyetina (TPOR) (Kota et al, 2008), ésta sería quizá la razón por la cual el linaje granulocítico se ve afectado en menor medida comparativamente con los linajes eritroide y megacariocítico, especialmente a bajos niveles de  $JAK2^{V617F}$  (Kota et al, 2008).

La cuantificación de la mutación  $JAK2^{V617F}$  es de gran interés en la evaluación de las neoplasias mieloproliferativas. Dicha medición es importante en el seguimiento de los pacientes que han recibido un trasplante de médula ósea o tratamiento con inhibidores de  $JAK2$ . La respuesta a esta terapia podría ser evaluada mediante la determinación de la carga del clon mutado aunque todavía es un tema en discusión.

El desarrollo de una metodología cuantitativa para determinar la carga alélica y expresión del alelo mutado  $JAK2^{V617F}$  en NMPs  $BCR-ABL1$  (-) clásicas, permite definir el tamaño del clon neoplásico y su nivel transcripcional lo cual podría tener importantes implicancias clínicas.

Aunque los inhibidores de  $JAK2$  disponibles han demostrado respuestas alentadoras en cuanto a la reducción del volumen del bazo y el control de los síntomas, no han podido lograr la reversión de la fibrosis en la médula ósea de pacientes con MF o reducir la carga del alelo mutado (Verstovsek et al, 2012).



Si bien la MF, PV y TE comparten el mismo marcador genético, el nivel de la carga alélica de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> difiere en las distintas entidades. Por lo tanto el dosaje de esta mutación podría ser responsable de los diferentes fenotipos clínicos. La carga alélica en bajos niveles se relaciona a un fenotipo de trombocitosis, en niveles intermedios a un fenotipo de eritrocitosis, mientras que los valores más altos se asocian con leucocitosis y mielofibrosis. En este estudio preliminar hemos podido corroborar las relaciones genotipo-fenotipo indicando la importancia del estudio de la carga alélica en la evolución y pronóstico de los pacientes.

## ***6. CONCLUSIONES***

## 6. CONCLUSIONES

- La cuantificación de la carga alélica promedio a nivel genómico (ADN) mostró un incremento en MF (media  $\pm$  ES) (62,01 $\pm$ 8,00), y PV (59,51 $\pm$ 6,01) respecto de TE (43,08 $\pm$ 6,49).
- Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la carga alélica genómica y los niveles de expresión de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en todas las patologías estudiadas.
- En 3 casos con PV se detectó un incremento de la expresión de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> respecto de la carga alélica genómica, indicando sobreexpresión de la mutación. Este fenómeno no se observó en MF y TE.
- La LOH indicando homocigosidad de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> se observó en 66,6% (6/9), 57% (12/21), 27% (3/11) de los casos con MF, PV y TE respectivamente, lo cual muestra una incidencia menor en TE coincidente con los datos de la literatura.
- En PV la homocigosidad de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> correlacionó con un aumento en el recuento de plaquetas y una tendencia al incremento de glóbulos blancos. En MF y TE no se observaron diferencias.

## ***7. BIBLIOGRAFIA***

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Amor-Vigil AM, et al. Introducción del estudio molecular de la mutación JAK2V617F en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2013; Vol. 29, Núm. 4. Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.
- Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, et al. Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity* 2012; 36: 239-50.
- Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M et al. JAK2V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007; 110: 4030- 6.
- Baxter E, Scott L, Campbell P, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054 – 1061.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141-9.
- Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, et al. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000; 19: 3902-3913.
- Birgegard G. Advances and challenges in the management of essential thrombocythemia. *The Adv Hematol* 2015; 6: 142-56.
- Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: A direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2009; 37: 1016-1021.
- Cascavilla N, De Stefano V, Pane F, et al. Impact of JAK2(V617F) mutation status on treatment response to anagrelide in essential thrombocythemia: an observational, hypothesis-generating study. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 2687-94.
- Constantinescu SN, Leroy E, Gryshkova V, et al. Activating Janus kinase pseudokinase domain mutations in myeloproliferative and other blood cancers. *Biochemical Society Transactions* 2013; Volume 41, part 4.
- Debeurme F, Lacout C, Moratal C, et al. JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to myeloproliferative neoplasm development in mice. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 2564-74.

- Deeg HJ, Bredeson C, Farnia S, et al. Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Patients with Myelofibrosis: Long-Term Success in all Age Groups. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 1883-7.
- Deininger M, Radich J, Burn TC, et al. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015; 126: 1551-4.
- Dos Santos LC, Ribeiro JC, Silva NP, et al. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33: 417-24.
- Duenas-Perez AB, Mead AJ. Clinical potential of pacritinib in the treatment of myelofibrosis. *Ther Adv Hematol* 2015; 6: 186–201.
- Elliott J, Suessmuth Y, Scott LM, et al. SOCS3 tyrosine phosphorylation as a potential bio-marker for myeloproliferative neoplasms associated with mutant JAK2 kinases. *Haematologica* 2009; 94: 576-80.
- Fourouclas N, Li J, Gilby DC, et al. Methylation Of The Suppressor Of Cytokine Signaling 3 Gene (*SOCS3*) In Myeloproliferative Disorders. *Haematologica* 2008; 93: 1635-1644.
- Furtado LV, Weigelin HC, Kojo SJ et al. A Multiplexed Fragment Analysis-Based Assay for Detection of JAK2 Exon 12 Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 15, No. 5.
- Geyer HL, Mesa RA. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? *Blood* 2014; 124: 3529-37.
- Gonzalez MS, De Brasi CD, Bianchini M et al. Improved diagnosis of the transition to JAK2 (V617F) homozygosity: the key feature for predicting the evolution of myeloproliferative neoplasms. *PLoS One* 2014; 9:e86401.
- Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 348-56.
- Griesshammer M, Gisslinger H, Mesa R. Current and future treatment options for polycythemia vera. *Ann Hematol* 2015; 94: 901–910.
- Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* 2007; 137: 244-7.

- Hitoshi Y, Lin N, Payan DG, et al. The current status and the future of JAK2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative diseases. *Int J Hematol* 2010; 91: 189-200.
- Ivan palomo G., Jaime Peireira G., Julia Palma B. (2009): Hematología Fisiopatología y diagnostico. Universidad de Talca, Chile.
- Jaime Pérez, J.C.; Gómez Almaguer, D. (2009): Hematología. La sangre y sus enfermedades. McGraw-Hill, México.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-8.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369: 2379-90.
- Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; 22: 1828-40.
- Kralovics R, Guan Y, Prehal J. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p ia frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30: 229-236.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser A, et al. A gain of function mutation of Jak2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl J Med* 2005; 352: 1779 – 1790.
- Larsen L and Ropke C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 2002; 110: 833–44.
- Lens D, Muxi P, Brugnini A, et al. Determinacion de la mutacion v617f del gen jak2 en los sindromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Rev Med Urug* 2007; 23: 122-125.
- Lev PR, Heller PG. Estudio Molecular en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas: mutación JAK2V617F. *Hematología* 2013; 17: 176-178.
- Levine R, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofobrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387 – 397.
- Levine RL, Gilliland GD. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112: 2190–2198.

- McLornan D, Percy M, McMullin MF. JAK2 V617F: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders. *Ulster Med J* 2006; 75: 112-119.
- Meyer SC, Levine RL. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 2051-9.
- Miguel Gallardo Delgado, 2012: "Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)" TESIS DOCTORAL UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE MEDICINA.
- Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H et al. Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016; 127: 325-32.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369: 2391-405.
- NoaLavi, MD. Calreticulin Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *Rambam Maimonides Med J*. 2014; 5: e0035.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472-3476.
- Passamonti F, Rumi E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica* 2009; 94: 7-10.
- Pietra D, Li S, Brisc A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111: 1686-9.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270.
- Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, et al. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000; 275: 29338-47.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* 2009; 94: 414-8.



- Sessarego M, Defferrari R, Dejana A, et al. Cytogenetic analysis in essential thrombocythemia at diagnosis and at transformation. A 12 year study. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 43: 57-6.
- Sociedad Argentina de Hematología. (2015): Guías de diagnóstico y tratamiento.
- Szymańska J, Smolewski P, Majchrzak A et al. Pro-Apoptotic Activity of Ruxolitinib Alone and in Combination with Hydroxyurea, Busulphan, and PI3K/mTOR Inhibitors in JAK2-Positive Human Cell Lines. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24: 195-202.
- Tefferi A, Mesa R, Schroeder G, et al. Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis. *Br J Haematol* 2001; 113: 763-771.
- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009; 115: 3842-7.
- Vannucchi A, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical correlates of Jak2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008; 22: 1299 – 1307.
- Vannucchi A, Antonioli E, Guglielmelli, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 V617F allele burden. *Leukemia* 2007; 21: 1952 – 1959.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5):937-51.
- Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of a acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280: 22788-22792.
- Ziakas PD. Effect Of JAK2 V617F On Thrombotic Risk In Patients With Essential Thrombocythemia: Measuring The Uncertain. *Haematologica* 2008; 93: 1412-1414.