



Universitat Autònoma
de Barcelona

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

**CLONALIDAD HEMATOPOYÉTICA EN LA POLICITEMIA VERA Y LA
TROMBOCITEMIA ESENCIAL Y SU PAPEL EN LA TRANSFORMACIÓN
MIELOFIBRÓTICA**

Memoria presentada por

Luz Martínez Avilés

para optar al grado de

Doctora en Biología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra Beatriz Bellosillo y el Dr Carles Besses
y la tutoría de la Dra Rosa Miró

Luz Martínez Avilés

Doctoranda

Dra Beatriz Bellosillo

Directora de tesis

Dr Carles Besses

Co-director de Tesis

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2015

La Dra Beatriz Bellosillo, Jefe de Sección del Laboratorio de Biología Molecular y el Dr Carles Besses, Jefe del Servicio de Hematología Clínica del Hospital del Mar y coordinador del grupo de investigación Clínica Aplicada en Hematología (IMIM).

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Clonalidad hematopoyética en la policitemia vera y la trombocitemia esencial y su papel en la transformación mielofibrótica”, presentada por Luz Martínez Avilés, para acceder al título de Doctora en Biología, se ha realizado bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida ante el tribunal correspondiente.

El trabajo se ha realizado en el laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica (Hospital del Mar) y en el grupo de investigación Clínica Aplicada en Hematología (IMIM).

Barcelona, 2015

Dra Beatriz Bellosillo

Dr Carles Besses

La elaboración de esta tesis se ha llevado a cabo gracias a las siguientes ayudas:

- Beca AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca predoctoral) obtenida del "Comissionat per a Universitats i Recerca del departament d' Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu" 2009-2011.
- Ayudas del Fondo de Investigación Sanitaria EC07/90791, PI10/01807, EC 10-136.
- Ayudas del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad), RD09/0076/00036, RD12/0036/0010.
- Ayuda de la "Xarxa de Bancs de Tumors" esponsorizada por el Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).
- Ayuda de la AECC-Catalunya contra el càncer 2011.
- Ayuda de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca 2009SGR929 y 2014SGR567.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	III
TABLAS	IX
FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS.....	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. HEMATOPOYESIS.....	3
1.1.1. Células hematopoyéticas	3
1.1.2. Regulación de la hematopoyesis.....	4
1.2. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS FILADELFIA NEGATIVAS	6
1.2.1. Policitemia Vera	7
1.2.1.1. Etiopatogenia	7
1.2.1.2. Características clínicas.....	8
1.2.1.3. Criterios diagnósticos	9
1.2.1.4. Evolución	12
1.2.1.5. Pronóstico	14
1.2.1.6. Tratamiento.....	15
1.2.2. Trombocitemia Esencial	17
1.2.2.1. Etiopatogenia	17
1.2.2.2. Características clínicas.....	17
1.2.2.3. Criterios diagnósticos	18
1.2.2.4. Evolución	20
1.2.2.5. Pronóstico	21
1.2.2.6. Tratamiento.....	22
1.2.3. Mielofibrosis Primaria	24
1.2.3.1. Etiopatogenia	24

ÍNDICE

1.2.3.2.	Características clínicas.....	24
1.2.3.3.	Criterios diagnósticos	25
1.2.3.4.	Evolución y pronóstico	26
1.2.3.5.	Tratamiento.....	27
1.3.	BIOMARCADORES DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.....	28
1.3.1.	Cultivos de progenitores hematopoyéticos	28
1.3.2.	Alteraciones cromosómicas	28
1.3.3.	Estudios de clonalidad mieloide.....	29
1.3.4.	Alteraciones moleculares	32
1.3.4.1.	JAK2	32
1.3.4.2.	Mutaciones en el gen de la trombopoyetina	42
1.3.5.	Otros marcadores moleculares en neoplasias mieloproliferativas.....	45
1.3.5.1.	Nuevos genes implicados en vías de señalización: <i>LNK, CBL, SOCS</i>	46
1.3.5.2.	Genes implicados en la regulación epigenética	49
1.3.5.3.	Genes implicados en la maquinaria del <i>splicing</i>	55
1.3.5.4.	Mutaciones en el gen <i>CALR</i>	58
1.4.	FACTORES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA AL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LAS NM	63
1.4.1.	Haplotipo 46/1 del gen <i>JAK2</i>	63
1.4.2.	Polimorfismo del gen <i>XPD</i>	64
1.4.3.	Polimorfismo del gen del receptor de los glucocorticoides.....	64
1.5.	BIOLOGÍA DE LA EVOLUCIÓN DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.....	65
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
	HIPÓTESIS	71
	OBJETIVOS	72
	RESULTADOS	73
3.	RESULTADOS	75

ÍNDICE

3.1.	TRABAJO I	76
3.2.	TRABAJO II	87
3.2.1.	Anexo al Trabajo II.....	97
3.2.1.1.	Reevaluación de los resultados obtenidos en el Trabajo II considerando el estado mutacional del gen <i>CALR</i>	97
3.2.1.2.	Actualización de las alteraciones moleculares detectadas en los pacientes con TE <i>JAK2V617F</i> negativos que evolucionaron a mielofibrosis o mielodisplasia, descritos en el Trabajo II.	99
3.3.	ANEXO: TRABAJO III.....	101
3.3.1.	Material suplementario.....	107
3.3.1.1.	Mutaciones en genes adicionales a <i>JAK2</i> en pacientes con MF post-PV y MF post-TE	107
3.3.1.2.	Características clínico-biológicas de los pacientes con MF post-PV o MF post-TE.	109
3.3.1.3.	Características clínico-biológicas de los pacientes con MFP.....	112
	DISCUSIÓN.....	117
4.	DISCUSIÓN.....	119
4.1.	Incidencia de los nuevos marcadores moleculares en neoplasias mieloproliferativas	121
4.2.	Significado clínico de la detección de una hematopoyesis clonal en la TE <i>JAK2</i> negativa	124
4.3.	Alteraciones moleculares en la transformación mielofibrótica de la PV y la TE <i>JAK2V617F</i> positiva y negativa	127
4.4.	Valor pronóstico de los nuevos marcadores.....	132
4.5.	Evolución y adquisición de alteraciones durante la progresión de las NM	134
4.6.	Detección de hematopoyesis clonal en personas sin evidencia de neoplasia hematológica.....	138
4.7.	Estudio de biomarcadores en la rutina diagnóstica de las neoplasias mieloproliferativas: algoritmo diagnóstico	141
4.7.1.	Incorporación de nuevos marcadores moleculares en el algoritmo diagnóstico .	142
4.7.2.	Utilidad de la determinación de clonalidad mieloide para el algoritmo diagnóstico	144

ÍNDICE

4.7.3.	Utilidad del cultivo de progenitores hematopoyéticos en el algoritmo diagnóstico	146
4.8.	Consideraciones prácticas para el análisis molecular de los marcadores moleculares	147
4.8.1.	Tipo de muestra	147
4.8.2.	Ácidos nucleicos	148
4.8.3.	Técnica empleada.....	149
4.8.4.	Interpretación de los resultados	151
	CONCLUSIONES	155
5.	CONCLUSIONES	157
	BIBLIOGRAFIA.....	159
	BIBLIOGRAFÍA	161
	ANEXOS	185
	ANEXOS	187

TABLAS

TABLAS

Tabla 1: Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008..... 6

Tabla 2: Criterios diagnósticos de la Policitemia Vera según la clasificación de la OMS 2008 11

Tabla 3: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Policitemia Vera según la clasificación de la OMS 11

Tabla 4: Evolución de la Policitemia Vera 13

Tabla 5: Criterios diagnósticos para la Mielofibrosis post-Policitémica según el *IWG-MRT*..... 14

Tabla 6: Criterios diagnósticos de la Trombocitemia Esencial según la clasificación de la OMS 2008 19

Tabla 7: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Trombocitemia Esencial según la clasificación de la OMS..... 20

Tabla 8: Criterios diagnósticos para la Mielofibrosis post-Trombocitémica según el *IWG-MRT*.... 21

Tabla 9: Criterios diagnósticos de la Mielofibrosis Primaria según la clasificación de la OMS 2008 25

Tabla 10: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria según la clasificación de la OMS..... 26

Tabla 11: Alteraciones citogenéticas más frecuentes en las NM..... 29

Tabla 12: Principales genes implicados en las NM..... 62

Tabla 13: Actualización de las características principales de los pacientes con TE JAK2V617F negativos que evolucionaron a mielofibrosis o mielodisplasia..... 100

Tabla 14: Frecuencias detectadas en los genes de la maquinaria del *splicing* en pacientes con MPF, TE y PV en fase crónica y en MF post-PV y MF post-TE 102

Tabla 15: Frecuencia de mutaciones en los genes analizados en pacientes con MF post-PV y MF-post-TE 107

Tabla 16: Características clínico-biológicas de los pacientes con MF post-PV o MF post-TE 109

Tabla 17: Características clínico-biológicas de los pacientes con MFP 112

Tabla 18: Adquisición y evolución de mutaciones en los pacientes con TE o PV evolucionados a mielofibrosis o mielodisplasia 134

FIGURAS

FIGURAS

Figura 1: Modelo jerárquico del desarrollo hematopoyético (*Alberts y col., 2002*¹)..... 4

Figura 2: Mecanismos mediante los cuales se puede producir la pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 9p (*Kralovics y col., 2005*¹⁵) 8

Figura 3: Esquema del patrón de inactivación del cromosoma X (PICX) durante la embriogénesis femenina según la hipótesis de Lyon (A). Desequilibrio del PICX durante un proceso neoplásico (B). 30

Figura 4: Estructura del gen *JAK2* y localización de las mutaciones más frecuentes..... 33

Figura 5: Vías de señalización activadas por distintas citocinas (*O’Shea y col., 2013*⁹³) 34

Figura 6: Papel epigenético de *JAK2* (*Vainchenker y col., 2011*¹⁰³) 35

Figura 7: Vías de señalización implicadas en la patogenia de las NM (*Vainchenker y col., 2011*¹⁰³) 37

Figura 8: Estructura del gen *MPL* 42

Figura 9: Mutaciones descritas en el gen *MPL*, que codifica para el receptor de la trombopoyetina 44

Figura 10: Estructura de los genes *LNK*, *CBL* y *SOCS* implicados en las vías de señalización y localización de las mutaciones más frecuentes 49

Figura 11: Actividad de las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* y las consecuencias de la generación de 2-HG en las vías de señalización en las neoplasias (*Prensner y col., 2011*²⁰⁶) 51

Figura 12: Estructura de los genes *TET2*, *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A* implicados en el proceso de metilación del ADN y localización de las mutaciones más frecuentes..... 52

Figura 13: Estructura de los genes *ASXL1* y *EZH2* implicados en el proceso de remodelación de la cromatina y localización de las mutaciones más frecuentes 54

Figura 14: Estructura de los genes *SF3B1*, *SRSF21* y *U2AF1* implicados en el proceso del *splicing* del ARN mensajero y localización de las mutaciones más frecuentes..... 58

Figura 15: Dominios funcionales de la proteína *CALR* y localización de las mutaciones más frecuentes 59

Figura 16: Modelos para explicar la progresión de una NM *JAK2* positiva a una LAM *JAK2* negativa (*modificado de Beer y col., 2010*²⁷⁷) 67

Figura 17: Electroferograma mostrando el patrón del análisis de microsatélites del polimorfismo D9S288 localizado cerca del locus de *JAK2*. A) Imagen que corresponde a la muestra del diagnóstico de la paciente 6, Tabla 18, en la que se observa un patrón de heterocigosidad para este polimorfismo. B) Imagen que corresponde a la muestra de la

fase mielofibrótica en la que se observa una disminución de uno de los alelos y un aumento del segundo alelo sugiriendo un proceso de recombinación mitótica. 137

Figura 18: Expansión clonal de células hematopoyéticas (*Genovese y col., 2014*³¹⁷) .. 140

Figura 19: Algoritmo diagnóstico de las NM incorporando nuevos marcadores moleculares 144

Figura 20: Resultados obtenidos de las bases bioinformáticas PolyPhen-2, SIFT y Align GVGD, en relación al potencial carácter patogénico de la mutación p.I671T del gen *SF3B1*..... 153

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

⁵¹Cr: Cromo 51

³²P: Fósforo 32

5 hmc: 5-Hidroximetilcitosina

5mc: 5-Metilcitosina

α-KG: alfa-cetoglutarato

AAS: Ácido Acetilsalicílico

AC: Acenocumarol

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ag: Anagrelida

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASXL1: Additional Sex Combs-like 1

ATP: Adenosín Trifosfato

BFU-E: Unidad Formadora de Colonias Eritroides (*Burst Forming Units-Erythroid*)

BFU-Meg: Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas (*Burst Forming Units-Megakaryocyte*)

BTK: Bruton Tirosina Cinasa

BU: Busulfán

c-CBL: Casitas B-cell lymphoma , proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase

CALR: Calreticulina

CFC: Células Formadoras de Colonias

CFC-Ba: Unidad Formadora de Colonias Basófilas (*Colony Forming Unit- Basophil*)

CFC-Eo: Unidad Formadora de Colonias Eosinófilas (*Colony Forming Unit-Eosinophil*)

CFC-GM: Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas-Macrofágicas (*Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*)

CFC-G: Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas (*Colony Forming Units –Granulocytic*)

CFC-M: Unidad Formadora de Colonias Mieloides (*Colony Formation Unit-Myeloid*)

CFU: Unidad Formadora de Colonias (*Colony Forming Unit*)

CFC-Oe: Unidad Formadora de Colonias de Osteoclastos (*Colony Formation Unit-Osteoclasts*)

CFU-E: Unidad Formadora de Colonias Eritroides (*Colony Forming Units-erythroid Granulocyte*)

CFU-L: Célula Germinal Linfoide

CFU-LM: Célula Germinal Linfomieloide

CFU-M: Célula Germinal Mieloide

CFU-Meg: Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas (*Colony Forming Unit-Megakaryocyte*)

CLP: Progenitor Linfoide Común

CMP: Progenitor Mieloide Común

CSF-G: Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas

CSF-GM: Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas y Monocíticas

dHPLC: *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*

EEC: Colonias Eritroides Endógenas (*Endogenous Eritroid Colonies*)

EPO: Eritropoyetina

EZH2: Enhancer of Zeste Drosophila Homolog 2

ABREVIATURAS

FEC: Factor Estimulador de Colonias
FEC-M: Factor Estimulador de Colonias Macrofágicas
FEC-G: Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas
FEC-GM: Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas y Monocíticas
FERM: Dominio homólogo a proteínas Ezrina, Radixina y Moesina (*band 4.1, ezrin, radixin, moesin*)
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)
FISH: Hibridación *in situ* Fluorescente (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
G6PD: Glucosa-6-fosfato
GMP: Progenitor Granulocítico/Macrofágico
GR: Receptor de Glucocorticoides
Hgb: Hemoglobina
HP1 α : Heterocromatina 1 alfa
HPRT: Hipoxantina Fosforribosiltransferasa
HSC: Célula Madre Hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)
HU: Hidroxiurea (Hidroxycarbamida)
HUMARA: Receptor de andrógenos humano
IDH1: *Isocitrate dehydrogenase 1*
IDH2: *Isocitrate dehydrogenase 2*
IDS: Iduronato-2-sulfatasa
IGF: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (*Insulin-like Growth Factor*)
IL: Interleucina
IFN: Interferón
IWG-MRT: *International working group for myelofibrosis research and treatment*
JAK2: *Janus Kinase 2*
LA: Leucemia Aguda
LAM: Leucemia Aguda Mieloide
LCN2: *Lipocalin 2*
LDH: Lactato Deshidrogenasa
LES: Leucemia Eosinofílica Crónica
LLC: Leucemia Linfocítica Crónica
LMC: Leucemia Mieloide Crónica
LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica
LNC: Leucemia Neutrofílica Crónica
LNK: *Lymphocyte Adaptor Protein*
LOH: Pérdida de Heterocigosidad (*Lost of Heterozygosity*)
MEP: Progenitor Megacariocítico/Eritrocítico
MF post-PV: Mielofibrosis post-policitémica
MF post-TE: Mielofibrosis post-trombocitémica
MFP: Mielofibrosis Primaria
MMA: Metaplasia Mieloide Agnogénica
MPL: *Myeloproliferative Leukemia Protooncogen*
MPP1: *Membrane protein, Palmitoylated 1*
NM: Neoplasia Mieloproliferativa
OMS: Organización Mundial de la Salud

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
Ph: Cromosoma Filadelfia (*Chromosome Philadelphia*)
PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)
PGK: Fosfoglicerato Cinasa
PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT
PICX: Patrón de Inactivación del Cromosoma X
PRC2: *Polycomb Repressive Complex*
PRMT5: *Protein Arginine Methyltransferase 5*
PV: Policitemia Vera
PVSG: *Polycythemia Vera Study Group*
RARS-T: Anemia Refractaria con Sideroblastos en anillo y Trombocitosis
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SCF: *Stem Cell Factor*
SF3B1: Splicing Factor 3B, Subunit 1
SHE: Síndrome Hipereosinofílico
SH2B3: SH2B Adaptor Protein 3 Gene
SHP-1: Tyrosine Phosphatase
SMD: Síndrome Mielodisplásico
SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)
SnRNA: *Small Nuclear RNA*
SnRNP: *Small Nuclear Ribonuclearprotein*
SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling
SRSF2: Splicing Factor Serine/Arginine-Rich, 2
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TE: Trombocitemia Esencial
TET2: Ten Eleven Translocation 2
TGF-B: Factor de Crecimiento Transformante Beta (*Transforming Growth Factor Beta*)
TM: Trombomodulina
TP53: *Tumor Protein P53*
TPO: Trombopoyetina
U2AF1: U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor
VEGF: Factor de Crecimiento Vascular y Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
XPD: ERCC2, EXCISION REPAIR, COMPLEMENTING DEFECTIVE, IN CHINESE HAMSTER, 2

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HEMATOPOYESIS

1.1.1. Células hematopoyéticas

La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los distintos elementos formes de la sangre a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética pluripotencial. En el adulto la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea donde estas células precursoras hallan el lecho y el microambiente adecuado para poder desarrollarse y diferenciarse en células maduras.

Las células más inmaduras o progenitores no se pueden reconocer mediante técnicas microscópicas ya que carecen de distintivos morfológicos precisos. La utilización de técnicas como los cultivos *in vitro*, o el marcaje de antígenos de diferenciación mediante anticuerpos monoclonales (inmunofenotipo) ha permitido identificar una célula madre pluripotente con capacidad de proliferación, diferenciación y autorrenovación conocida como célula madre linfomieloide (CFU-LM).

A partir de la CFU-LM aparecen la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide (CFU-M). La CFU-M estimulada por el microambiente puede dar lugar a otras poblaciones celulares comprometidas hacia la diferenciación de una o varias líneas mieloides denominadas células formadoras de colonias (CFC) o unidad formadora de colonias (CFU) de las que se conocen distintos tipos según hacia qué tipo celular se diferencien: BFU-E y CFU-E para la línea eritroide; CFC-GM, CFC-G y CFC-M para la línea granulomonocítica; CFC-Eo para los eosinófilos; CFC-Ba para los basófilos; y BFU-Meg y CFU-Meg para los megacariocitos (Figura 1).

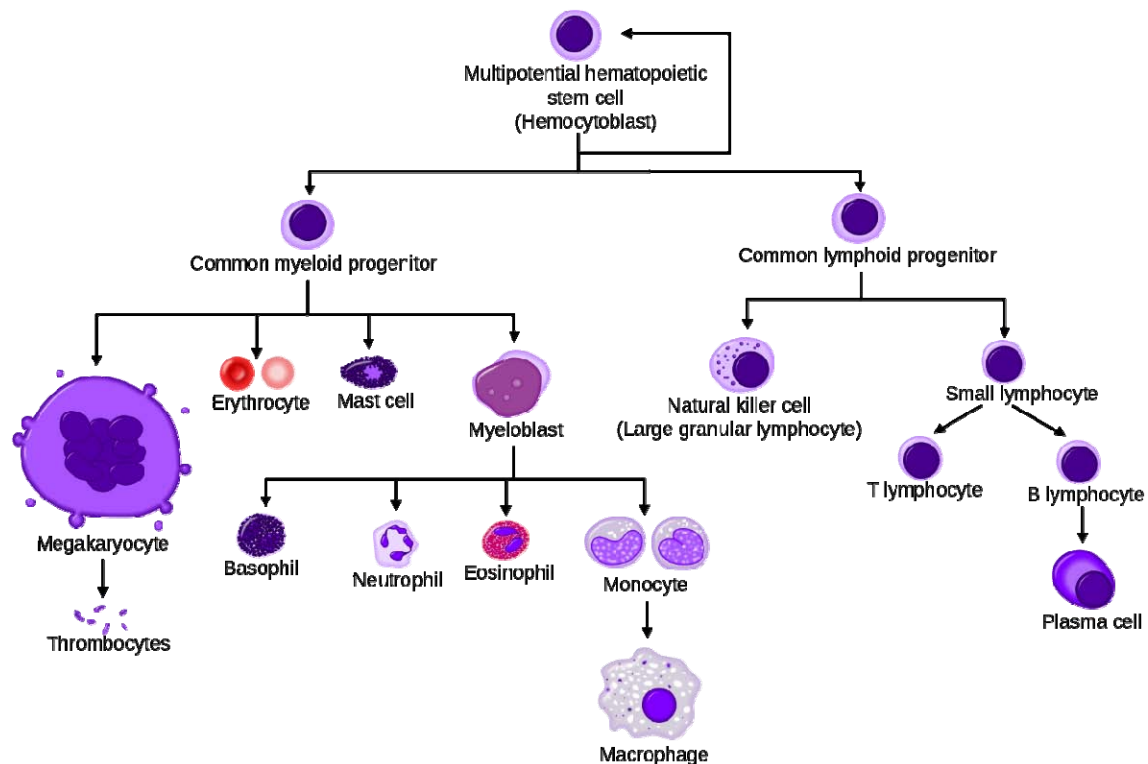


Figura 1: Modelo jerárquico del desarrollo hematopoyético (Alberts y col., 2002¹)

Mediante análisis inmunofenotípico podemos identificar los distintos progenitores mieloides, que forman una pequeña población medular heterogénea caracterizada por presentar el antígeno CD34 y débilmente el CD45. La diferenciación de estas células va asociada a la pérdida de expresión del CD34 y a la expresión de otros antígenos característicos de los distintos estadios de maduración y diferenciación. Existen marcadores asociados clásicamente a células hematopoyéticas maduras como por ejemplo la glucoforina en eritrocitos, CD14 en monocitos, CD41 en plaquetas, CD19 en linfocitos B, CD3 en linfocitos T o CD56 en células NK.

1.1.2. Regulación de la hematopoyesis

Existen varios mecanismos complejos implicados en la regulación de la hematopoyesis como la interacción de las células entre sí, la interacción con su microambiente, con la matriz extracelular y con factores de crecimiento entre los cuales se incluyen la

eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO), los factores estimuladores de colonias (FEC) y las interleucinas (IL). Por otro lado, también existe una serie de factores inhibitorios que tienen como función mantener la masa celular hematopoyética por inhibición de la fase mitótica celular, previniendo la pérdida de células madre y progenitores hematopoyéticos.

Aunque inicialmente se creía que cada factor de crecimiento tenía una acción específica sobre una línea celular concreta, se ha comprobado que la mayoría de ellos actúan sinérgicamente en la diferenciación de distintas líneas celulares²⁻⁵. La EPO es la principal hormona encargada de la proliferación de los precursores eritroides y su diferenciación a eritrocitos. La EPO está codificada por un gen localizado en el cromosoma 7 (7q11-22) y se sintetiza principalmente en los riñones y en menor grado en el hígado.

La TPO es un factor de crecimiento codificado por un gen localizado en el cromosoma 3 (3q26-27) producido principalmente por el hígado pero también por el riñón. Su función principal es la regulación de la megacariopoyesis⁶.

Entre los distintos factores estimuladores de colonias se encuentran los factores estimuladores de colonias macrófágicas (FEC-M), los estimuladores de colonias granulocíticas (FEC-G) y los factores estimuladores de colonias granulomonocíticas (FEC-GM). El FEC-M está codificado por un gen localizado en el cromosoma 5 (5q33), lo sintetizan distintos tipos celulares y actúa induciendo preferentemente el crecimiento y la maduración de los macrófagos. EL FEC-GM está codificado por un gen localizado en el cromosoma 5 (5q23-31) y lo producen los linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos y actúa induciendo, principalmente, el crecimiento de precursores granulomonocíticos. Finalmente, el FEC-G está codificado por un gen localizado en el cromosoma 17 (17q21-22), lo producen las células endoteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos e induce, mayoritariamente, la proliferación y la diferenciación de la línea granulocítica.

Otros de los factores de crecimiento son las interleucinas (IL 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9,11), que están producidas por varios tipos celulares y que tienen distintas funciones. Cada IL actúa favoreciendo la proliferación y la diferenciación de distintas líneas celulares hematopoyéticas junto con otros factores de crecimiento.

1.2. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS FILADELFIA NEGATIVAS

Las neoplasias mieloproliferativas (NM) son enfermedades clonales de la célula madre hematopoyética caracterizadas por la proliferación de células maduras de una o varias líneas mieloides (granulocítica, eritroide, megacariocítica o mastocitos) y que comparten características clínicas y biológicas como hiper celularidad en médula ósea con predominio de una línea específica, esplenomegalia, propensión al desarrollo de complicaciones vasculares y riesgo de progresión a mielofibrosis y leucemia aguda.

Las neoplasias mieloproliferativas incluyen las siguientes entidades: la leucemia mieloide crónica (LMC), la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP), conociéndose como NM clásicas, y la leucemia neutrofilica crónica (LNC), la leucemia eosinofílica crónica (LES), la mastocitosis y las neoplasias mieloproliferativas inclasificables (Tabla 1). La LMC se asocia al gen de fusión *BCR-ABL1* localizado en el cromosoma Filadelfia (*Philadelphia*, Ph), que es el resultado de una translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22 que se denota como $t(9;22)(q34;q11.21)$ ⁷⁻⁹. El resto de NM que no presentan el cromosoma Ph se diagnostican en base a sus características clínicas, morfológicas, citogenéticas y moleculares.

Tabla 1: Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008

Leucemia Mieloide Crónica, *BCR-ABL1* positiva (LMC)
Policitemia Vera (PV)
Mielofibrosis Primaria (MFP)
Trombocitemia Esencial (TE)
Leucemia Neutrofilica Crónica (LNC)
Leucemia Eosinofílica Crónica (LES)
Mastocitosis
Neoplasias Mieloproliferativas inclasificables

1.2.1. Policitemia Vera

1.2.1.1. Etiopatogenia

La policitemia vera es una NM que se caracteriza por una proliferación anormal de la célula madre pluripotente que resulta en una hematopoyesis clonal principalmente de la línea eritroide pero también de los granulocitos y los megacariocitos.

En el año 1951 Dameshek describió por primera vez el concepto de síndromes mieloproliferativos y sugirió que la PV, la TE, la MFP y la LMC eran entidades muy próximas entre sí, en las que había un incremento en la proliferación de células mieloides debido, probablemente, a una alteración desconocida que estimulaba dicha proliferación ¹⁰. Años más tarde, en 1974 se describió que los progenitores eritroides de la médula ósea de pacientes con PV podían cultivarse *in vitro* en ausencia de EPO ¹¹, lo cual sugería que se trataba de un proceso probablemente neoplásico y que por tanto existía un origen clonal de la enfermedad. Este origen clonal se confirmó más tarde mediante estudios que analizaban los patrones de expresión de distintas isoformas de polipéptidos como la glucosa-6-fosfato (G6PD). En mujeres informativas para este marcador, se demostró que todas las células de la clona maligna expresaban la misma isoforma y, por tanto, el mismo patrón de inactivación del cromosoma X (PICX), sugiriendo que todas las células neoplásicas provenían de una célula hematopoyética común al linaje eritroide y granulocítico ^{12,13}.

A pesar de estos avances en la comprensión de la patogenia de las neoplasias mieloproliferativas, las alteraciones genéticas implicadas en la patogenia de la PV no se empezaron a conocer hasta que en el estudio de Kralovics *y col.* se observó que el 33% de los pacientes con PV presentaban pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 9, debido a un proceso de recombinación mitótica, y no por deleciones intersticiales o terminales, motivo por el cual no se podía detectar mediante citogenética convencional ¹⁴ (Figura 2). Más tarde, en el año 2005, se descubrió la mutación p.V617F del gen *JAK2*, localizado en el cromosoma 9 y que se detecta en un 95% de los pacientes con PV.

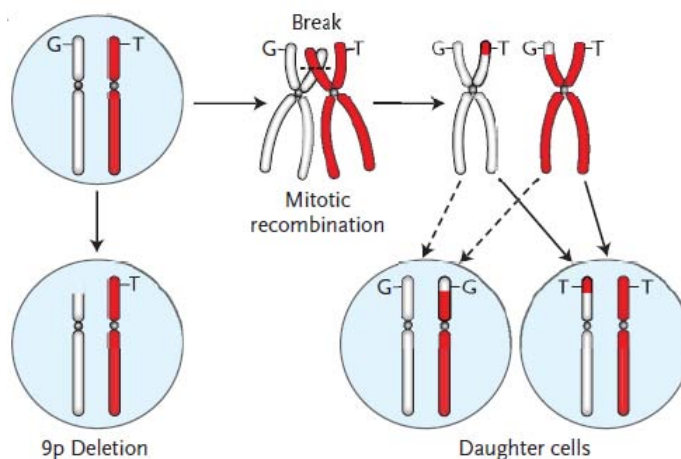


Figura 2: Mecanismos mediante los cuales se puede producir la pérdida de heterocigosis (LOH) del cromosoma 9p (Kralovics y col., 2005¹⁵)

1.2.1.2. Características clínicas

La incidencia de la PV es mayor en personas de edad avanzada y oscila entre 0,7-2,6 casos por cada 100.000 habitantes en Europa y América del Norte. La media de edad en el momento del diagnóstico es de 59 años en los varones y de 62 años en las mujeres. La distribución entre hombres y mujeres es prácticamente del 1:1¹⁶.

Aproximadamente entre un 15-35% de los casos se diagnostican de forma casual tras un análisis de rutina.

Gran parte de las manifestaciones clínicas de la PV son consecuencia directa de la proliferación excesiva de las distintas líneas celulares hematopoyéticas que participan en el proceso. Los pacientes con PV pueden presentar distintos síntomas como pérdida de peso, molestias epigástricas, prurito, astenia, cefaleas, parestesia, eritromelalgia, gota o esplenomegalia en un tercio de los casos. Los pacientes también pueden presentar metaplasia mieloide que se evidencia con esplenomegalia palpable y con hepatomegalia en un 35-40% y 20-30%, respectivamente. Las complicaciones trombóticas son las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con PV. El estudio del Grupo Italiano de la Policitemia vera sobre más de 1.200 pacientes reportó que un 14% de los pacientes presentaron trombosis antes del diagnóstico y el 20% como primera manifestación de la enfermedad¹⁷. La tasa de trombosis durante el seguimiento fue de 3,4%/año (la historia de trombosis fue predictiva de un segundo episodio trombótico) y la mortalidad global fue de 2,9/100 pacientes y año.

Las trombosis arteriales inciden fundamentalmente en la circulación cerebral, coronaria y arterial periférica. Por otro lado, las trombosis venosas ocurren con mayor frecuencia en las venas profundas de las extremidades inferiores, pudiendo provocar embolismos pulmonares, aunque también pueden aparecer en las venas hepáticas, sistema portal o venas mesentéricas.

El principal factor de riesgo asociado a las complicaciones vasculares trombóticas es el hematocrito. En 1978 Pearson y *cols.* describieron la estrecha relación existente entre la cifra de hematocrito y la tasa de complicaciones vasculares oclusivas, observando la menor tasa de trombosis cuando el hematocrito se situaba por debajo de 45% ¹⁸. Recientemente, el ensayo clínico aleatorizado *Cytoreductive Therapy in Polycythemia Vera* (CYTO-PV) ha demostrado que mantener un hematocrito por debajo de 45% se asocia a una menor incidencia de muerte por causa cardiovascular y de episodios trombóticos ¹⁹.

Las dos principales variables clínicas asociadas al riesgo trombótico son la edad de más de 60-65 años y una historia previa de trombosis ²⁰. La existencia de una de estas dos variables, o de las dos, sitúa al paciente en la categoría de alto riesgo de trombosis y justifica el inicio de una citorreducción.

Las complicaciones hemorrágicas son frecuentes en la PV puesto que el 30-40% de los pacientes presentan algún tipo de manifestación hemorrágica durante el curso de la enfermedad ²¹, siendo las hemorragias gastrointestinales las más frecuentes. En el estudio italiano, la hemorragia representó el 2,6% de las causas de mortalidad ¹⁷. La predisposición a padecer una complicación hemorrágica se atribuye a las alteraciones cualitativas plaquetarias que se pueden acentuar por la administración de antiagregantes y/o antiinflamatorios, así como la cirugía que determina una propensión a la aparición de hemorragia cuando la enfermedad no está controlada.

1.2.1.3. Criterios diagnósticos

En la práctica clínica, el primer paso en el diagnóstico de una posible PV es la valoración de la eritrocitosis, que se debe evaluar de acuerdo a los valores del hematocrito. Los valores de referencia del límite alto de normalidad del hematocrito, según Pearson son: 0,51 L/L y 0,48 L/L para varones y mujeres, respectivamente ²². Un hematocrito aumentado se debe confirmar antes de proceder a otras exploraciones complementarias.

Una vez confirmado el aumento del hematocrito, el siguiente paso es descartar por anamnesis la existencia de causas secundarias de eritrocitosis (especialmente de origen respiratorio y/o tabaquismo). En caso negativo, la determinación de la mutación JAK2V617F es la prueba de mayor coste-efectividad al confirmar o excluir en un 95% de casos la etiología mieloproliferativa o secundaria, respectivamente, de la eritrocitosis. Si la mutación JAK2V617F es negativa pero el paciente presenta una concentración de eritropoyetina baja o existe sospecha clínica de policitemia vera, el siguiente paso sería determinar la presencia de mutaciones en el exón 12 de *JAK2*. Existen pacientes con mutación de JAK2V617F que presentan trombocitosis y valores altos de hemoglobina y hematocrito sin llegar a los valores de hemoglobina requeridos por la OMS 2008 como definitorios de PV. Estos casos que pueden llegar a representar hasta el 45% del total de pacientes con PV constituyen un dilema diagnóstico entre PV y TE. En esta situación, la determinación de la masa eritrocitaria o citemia utilizando métodos isotópicos (hematíes marcados con ^{51}Cr) permite diferenciar entre PV (aumento del más del 25% del valor normal calculado para el paciente) de los pacientes con TE (valor < 25% de incremento de la citemia)²³. Cabe mencionar, que un varón con un hematocrito superior a 0,60 L/L y una mujer con un hematocrito superior a 0,56 L/L siempre tienen una eritrocitosis absoluta y por tanto no requieren la determinación de la masa eritrocitaria.

Actualmente, según los criterios revisados de la OMS 2008, el diagnóstico de la PV requiere la integración de características clínicas, parámetros biológicos y la histología de la médula ósea. Para cumplir el diagnóstico de PV según los criterios de la OMS 2008, se requiere que se cumplan los dos criterios mayores y un criterio menor, o bien la presencia del primer criterio mayor junto con dos criterios menores (Tabla 2).

Tabla 2: Criterios diagnósticos de la Policitemia Vera según la clasificación de la OMS 2008

Criterios Mayores:

1. El paciente debe presentar una de las siguientes características:
 1. Hgb > 18,5 g/dL (hombres) o Hgb > 16,5 g/dL (mujeres)
 2. Hgb > 17 g/dL (hombres) o Hgb > 15 g/dL (mujeres) si se asocia a un incremento mantenido de > 2 g/dL por encima del valor basal que no puede atribuirse a la corrección de una deficiencia de hierro
 3. Hgb o hematocrito mayor que el percentil 99 para el rango de referencia según la edad, sexo o altitud de la residencia
 4. Masa o volumen eritrocitario > 25% de la media normal prevista
 2. Presencia de la mutación JAK2V617F u otra mutación funcionalmente similar como las mutaciones en el exón 12 de JAK2
-

Criterios Menores:

1. Panmielosis en médula ósea
 2. Niveles de eritropoyetina (EPO) sérica por debajo del rango de normalidad
 3. Crecimiento endógeno de colonias eritroides (EECs) *in vitro*
-

La nueva propuesta de criterios diagnósticos de la PV que está siendo elaborada por la OMS modifica los criterios de la clasificación actual de 2008, pues incorpora el hematocrito, disminuye las cifras actuales de hemoglobina y propone la inclusión de la biopsia medular como criterio mayor²⁴ (Tabla 3).

Tabla 3: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Policitemia Vera según la clasificación de la OMS

Criterios Mayores:

1. Hemoglobina > 16,5 g/dL (hombres), > 16g/dL (mujeres) o hematocrito > 49% (hombres) o > 48% (mujeres)
 2. Panmielosis en médula ósea con megacariocitos pleomórficos
 3. Mutación en JAK2
-

Criterios Menores:

1. Niveles de eritropoyetina (EPO) sérica por debajo del rango de normalidad
-

El diagnóstico de PV requiere el cumplimiento de los tres criterios mayores o bien de los dos primeros criterios mayores y un criterio menor.

1.2.1.4. Evolución

La evolución de una PV puede transcurrir por una serie de fases o estadios que se pueden clasificar en:

Fase asintomática, que es la fase inicial en la que sólo se detecta una eritrocitosis aislada que puede estar asociada o no a trombocitosis y/o leucocitosis y esplenomegalia.

Fase de eritrocitosis sintomática, que es la que se asocia a un aumento del hematocrito seguida por una fase inactiva durante la cual la enfermedad parece estable.

Fase post-policitémica con metaplasia mieloide, en que se observan citopenias como anemia asociadas a una hematopoyesis ineficiente debido a la presencia de fibrosis en médula ósea así como a hematopoyesis extramedular.

Otra posibilidad es que se produzca una transformación a leucemia aguda, habitualmente de tipo mieloide (LAM) y con menor frecuencia evolución a mielodisplasia (Tabla 4).

Tabla 4: Evolución de la Policitemia Vera

Estadio	Características clínicas
Fase asintomática ↓	Esplenomegalia Eritrocitosis aislada Trombocitosis aislada
Fase sintomática ↓	Eritrocitosis Trombocitosis Leucocitosis Esplenomegalia Trombosis Hemorragia Prurito
Fase inactiva	Reducción de los requerimientos de flebotomías o quimioterapia
Fase de agotamiento: Mielofibrosis post-policitémica ↓	Anemia Síndrome leucoeritroblástico Trombocitopenia o trombocitosis Incremento de la esplenomegalia Sistemas sistémicos (fiebre, adelgazamiento)
Leucemia aguda mieloide	

La transformación a mielofibrosis puede ser una complicación de la PV que ocurre en un 16% de los pacientes a los 10 años y en el 34% de los casos a los 15 años, independientemente de la edad, sexo, tamaño del bazo, leucocitosis, trombocitosis o tratamiento citorrreductor ²⁵.

El *International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT)* propone los siguientes criterios para el diagnóstico de la MF post-policitémica (MF post-PV) ²⁶ (Tabla 5).

Tabla 5: Criterios diagnósticos para la Mielofibrosis post-Policitémica según el IWG-MRT

Criterios requeridos

1. Documentación de un diagnóstico previo de Policitemia Vera definido según los criterios de la OMS ²⁷
 2. Fibrosis medular grado 2-3 (en escala 0-3) ²⁸ o grado 3-4 (en escala 0-4) ^{a 29}
-

Criterios adicionales (se requieren dos criterios)

1. Anemia^b o pérdida mantenida del requerimiento de flebotomías (en ausencia de terapia citorreductora) o de tratamiento citorreductor de la eritrocitosis
 2. Síndrome leucoeritroblástico en sangre periférica
 3. Aumento de esplenomegalia de ≥ 5 cm (distancia de la punta del bazo a partir del margen costal izquierdo) o aparición de esplenomegalia palpable
 4. Desarrollo de ≥ 1 de tres síntomas constitucionales: $> 10\%$ de pérdida de peso en 6 meses, sudores nocturnos o fiebre inexplicable ($> 37,5^{\circ}\text{C}$)
-

^aGrado 2-3 según la clasificación europea ²⁸: difuso, con frecuencia trama de reticulina densa con o sin fibrosis colágena (en caso de existir fibrosis colágena ésta es positiva en la tinción de tricrómico) .Grado 3-4 según la clasificación estándar ²⁹ aumento difuso y denso de la trama de reticulina densa con fibrosis colágena focal y/o osteoesclerosis focal o con incrementos significativos de fibrosis colágena frecuentemente asociados a osteoesclerosis significativa

^b Por debajo del rango de referencia apropiado a la edad, sexo y altura

1.2.1.5. Pronóstico

Se estima que la mediana de supervivencia en pacientes con PV sin tratamiento es de 18 meses mientras que la supervivencia de los pacientes tratados es de una mediana de 14 años ¹⁶. Los pacientes con menos de 50 años tienen una mediana de supervivencia superior a 23 años. El estudio ECLAP sobre 1.638 pacientes con PV indicó que las causas de mortalidad son: 41% trombosis, 13% transformación hematológica, 4% sangrado, 20% otras neoplasias y 22% otras causas ³⁰. En el grupo de pacientes menores de 50 años, el riesgo acumulado de transformación a leucemia aguda y de mielofibrosis a los 20 años es del 15% y 10%, respectivamente ³¹.

1.2.1.6. Tratamiento

Flebotomías. Constituyen el tratamiento esencial de la PV. Su objetivo es reducir de forma rápida el riesgo trombótico causado por el aumento de la masa eritrocitaria. El hematocrito diana que se debe conseguir en las flebotomías debe ser inferior a 45% ¹⁹.

Antiagregantes. El estudio europeo ECLAP demostró la importancia de la administración de dosis bajas de ácido acetilsalicílico (AAS, 100mg/día) como profilaxis primaria antitrombótica que reduce la mortalidad por eventos cardiovasculares y la tasa de complicaciones trombóticas graves sin incremento significativo del riesgo de sangrado grave ³⁰. La administración de AAS y el control estricto de los factores de riesgo cardiovascular, constituyen dos aspectos fundamentales en todos los pacientes con PV independientemente de la categoría de riesgo de trombosis a la que pertenezcan.

Quimioterapia. Los principales agentes mielodepresores utilizados en el tratamiento de la PV son el fósforo radioactivo (³²P), el busulfán (BU), el pipobromán y la hidroxiurea (HU).

El ³²P demostró ser un agente eficaz en el control de la PV. Actúa por incorporación del ortofosfato de ³²P en los ácidos nucleicos de las células con una elevada capacidad de proliferación. La principal indicación de este tratamiento es en pacientes seleccionados de edad muy avanzada que no pueden seguir un control con la regularidad adecuada. Su utilización actual es minoritaria.

El busulfán es un agente alquilante que puede utilizarse como segunda línea de tratamiento citorreductor en aquellos pacientes de edad avanzada que muestran resistencia o intolerancia a la hidroxiurea. Es un fármaco muy efectivo, consiguiendo en un 80% de pacientes una mielosupresión duradera que puede prolongarse, una vez cesado su uso, durante meses o años. Su principal inconveniente radica en el mayor riesgo de evolución leucémica al administrarse en pacientes que ya habían recibido previamente hidroxiurea ³².

El pipobromán es un derivado piperacínico que actúa por un mecanismo de tipo alquilante, utilizado durante muchos años en el tratamiento de los pacientes con PV pero que en la actualidad se ha abandonado al observarse un alto riesgo de transformación aguda en una serie clínica de pacientes con un seguimiento muy prolongado ³³.

La hidroxiurea es el agente mielodepresor más utilizado en el tratamiento de la PV y de la TE. Se trata de un antimetabolito que interfiere en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) por inhibición de la ribonucleótido reductasa. Actualmente, la

HU se considera el agente quimioterápico de elección en los casos en los que se necesita controlar la panmielosis de la enfermedad. La *European LeukemiaNet* recomienda la hidroxiurea como primera línea de tratamiento citorreductor en los pacientes con PV de alto riesgo de trombosis ³⁴. Un 24% de pacientes tratados con hidroxiurea presentan resistencia o intolerancia al fármaco durante la evolución clínica. Los pacientes resistentes a hidroxiurea presentan una escasa supervivencia por un mayor riesgo de evolución a mielofibrosis y/o leucemia aguda ³⁵.

Interferón. El interferón (IFN) representa una importante opción de tratamiento en pacientes seleccionados con PV. Su mecanismo de acción es múltiple y complejo. Entre sus mecanismos está la activación de la función celular del sistema inmune, la inhibición de la angiogénesis, la inducción de la expresión de genes pro-apoptóticos y la supresión de la proliferación de progenitores hematopoyéticos ³⁶. En la actualidad se utilizan más las formas galénicas pegiladas que el interferón recombinante, aunque su indicación en PV no está autorizada en Europa. El interferón pegilado consigue un 80% de respuestas hematológicas completas y un 18-28% de respuestas moleculares completas (desaparición de la carga alélica de JAK2V617F en sangre periférica), algunas de las cuales pueden mantenerse incluso después de la suspensión del tratamiento. Su principal inconveniente son los efectos secundarios que causan interrupción del tratamiento en un 25-45% de los pacientes. La existencia de otras mutaciones aparte de JAK2V617F, como mutaciones en *TET2*, en los pacientes tratados con interferón pegilado parece reducir la tasa de obtención de respuestas moleculares cuando se compara a la de los pacientes con la mutación JAK2V617F únicamente ^{37,38}.

Anagrelida. La anagrelida (Ag) está indicada en el control de la trombocitosis extrema en un paciente con PV cuyo tratamiento se basa principalmente en flebotomías.

Antiagregantes. Las dosis habituales de ácido acetilsalicílico (AAS) están contraindicadas en pacientes con PV debido a un aumento en la incidencia de problemas hemorrágicos. Por el contrario, se ha demostrado que a dosis bajas (75-100 mg) la aspirina es efectiva como profilaxis primaria antitrombótica.

Ruxolitinib. Muy recientemente, el inhibidor antiJAK1/JAK2 ruxolitinib ha sido aprobado para el tratamiento de los pacientes con PV que muestran resistencia, respuesta inadecuada o intolerancia al tratamiento con hidroxiurea. Comparado con el tratamiento convencional, ruxolitinib consigue un mejor control del hematocrito por debajo del 45% y

una mayor reducción del volumen esplénico, así como un buen control de los síntomas

39

1.2.2. Trombocitemia Esencial

1.2.2.1. Etiopatogenia

La TE es una neoplasia mieloproliferativa *BCR-ABL1* negativa caracterizada por trombocitosis persistente, un riesgo aumentado de trombosis y/o hemorragia y una tendencia a la transformación a mielofibrosis y a leucemia aguda.

Se desconoce la etiología de la TE pero Fialkow y *col.* demostraron que se trataba de una enfermedad clonal originada en una célula hematopoyética pluripotente a través de estudios utilizando el locus, ligado al cromosoma X, de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. La presencia de una única isoenzima en plaquetas, granulocitos y eritrocitos en los pacientes con TE estableció el origen clonal común de la enfermedad en una célula progenitora ⁴⁰.

1.2.2.2. Características clínicas

La TE es la NM *BCR-ABL1* negativa más frecuente siendo su incidencia de 1,03-2,6 casos por 100.000 habitantes/año y la media de edad en el momento del diagnóstico es de 60 años, existiendo un predominio del sexo femenino (relación mujer/hombre, 1,6:1). La TE se caracteriza por un incremento persistente de la cifra de plaquetas ($\geq 450 \times 10^9/L$) en sangre periférica, hiperplasia megacariocítica en médula ósea y una tendencia a presentar complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas.

Las principales causas de morbilidad y mortalidad en la TE son los episodios trombóticos y/o hemorrágicos que con frecuencia aparecen durante el curso clínico de la enfermedad. Las complicaciones hemostáticas son principalmente de tres tipos: trombóticas, hemorrágicas y oclusivas microvasculares por alteración de la microcirculación. La incidencia de complicaciones trombóticas es variable según las series clínicas y oscila con una frecuencia del 7-29% en la presentación clínica y del 5-30% durante el seguimiento.

Los factores clínicos asociados con un mayor riesgo trombótico son la edad superior a 60 años y la historia de trombosis previa al diagnóstico o en el momento del mismo ^{41,42}. Las complicaciones trombóticas arteriales son más frecuentes que las venosas e incluyen el infarto cerebral, el accidente isquémico transitorio, oclusiones arteriales de la retina, infarto agudo de miocardio, angina inestable e isquemia periférica aguda. Las complicaciones trombóticas venosas incluyen la trombosis venosa profunda, el embolismo pulmonar, la trombosis esplácnica (síndrome de Budd-Chiari y trombosis venosa portal) y la trombosis de los senos venosos cerebrales.

La patogenia de la trombosis es compleja y comprende los factores relacionados con el paciente, como la edad, la historia de trombosis y los factores de riesgo cardiovascular y los factores asociados a la enfermedad como la trombocitosis, la leucocitosis, el estado mutacional y el denominado estado protrombótico. Respecto a este último, entre otros mecanismos, se ha involucrado la activación de los granulocitos neutrófilos con liberación de enzimas proteolíticas, expresión aumentada de CD11b, la activación de las plaquetas con expresión de P-selectina y factor tisular y la liberación de micropartículas después de la interacción celular de los neutrófilos con las plaquetas y las células endoteliales. Así mismo, el estado de hipercoagulabilidad se manifiesta por aumento de las concentraciones de marcadores plasmáticos de activación del sistema hemostático y de activación del endotelio vascular. Algunos pacientes JAK2V617F positivos muestran disminución de la concentración de proteína S libre que conlleva un fenotipo de resistencia adquirida a la proteína C ⁴³.

Las complicaciones hemorrágicas ocurren en el 3-18% de pacientes al diagnóstico y en el 4-14% durante la evolución clínica. El sitio más frecuentemente afectado es el tracto digestivo. Otras localizaciones de sangrado incluyen la piel y las mucosas, el tracto urinario y los tejidos blandos.

1.2.2.3. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de TE se basa en los criterios establecidos por la OMS en 2008. Los criterios diagnósticos exigen la existencia de una trombocitosis persistente $\geq 450 \times 10^9/L$, hiperplasia megacariocítica en médula ósea con fibrosis mínima o ausente, la demostración de un marcador clonal, la exclusión de otras neoplasias mieloproliferativas clásicas u otras neoplasias mieloides con trombocitosis acompañante y la ausencia de

causas de trombocitosis secundaria. Para establecer el diagnóstico de TE según los criterios de la OMS se deben cumplir los 4 criterios descritos en la [Tabla 6](#).

Tabla 6: Criterios diagnósticos de la Trombocitemia Esencial según la clasificación de la OMS 2008

1. Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ persistente ^a
 2. Presentar en la biopsia de médula ósea, proliferación megacariocítica compuesta por elementos grandes y maduros. Ausencia o escasa proliferación eritroide y granulocítica
 3. No cumplir los criterios de la PV ^b, la MFP ^c, la LMC *BCR-ABL1* positiva ^d, el SMD ^e u otra neoplasia mieloide, según la OMS
 4. Demostración de la mutación JAK2V617F u otro marcador de clonalidad, o en ausencia de la mutación JAK2V617F, descartar evidencia de trombocitosis reactiva ^f
-

a Mantenido durante el proceso diagnóstico

b Requiere fracaso a la terapia de hierro para aumentar los niveles de hemoglobina y el hematocrito hasta el rango de la policitemia vera. No se requiere la medición de la masa eritrocitaria

c Requiere la ausencia de fibrosis reticulínica, fibrosis colágena, leucoeritroblastosis en sangre periférica o marcada hiper celularidad en médula acompañada por morfología megacariocítica típica de la mielofibrosis primaria incluyendo megacariocitos de pequeño a gran tamaño con una relación núcleo/citoplasma aberrante, núcleos hiper cromáticos y de aspecto irregular y agrupaciones densas

d Requiere la ausencia del gen de fusión *BCR-ABL1*.

e Requiere la ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis.

f Las causas de trombocitosis reactiva incluye el déficit de hierro, esplenectomía, cirugía, infección, inflamación, enfermedades del tejido conectivo, cáncer metastásico y enfermedades linfoproliferativas. Sin embargo, la presencia de una situación asociada a trombocitosis reactiva puede no excluir la posibilidad de TE si se cumplen los tres primeros criterios

La nueva propuesta de criterios diagnósticos para la TE que modifican los actuales criterios de la clasificación actual de 2008 se muestran en la [Tabla 7](#) ²⁴.

Tabla 7: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Trombocitemia Esencial según la clasificación de la OMS

Criterios Mayores:

1. Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$
2. Proliferación megacariocítica con morfología grande y madura. Proliferación trilineaje en médula ósea con megacariocitos pleomórficos
3. No cumplir los criterios de la OMS para el diagnóstico de LMC, PV, MFP, SMD u otra neoplasia mieloproliferativa
4. Presencia de la mutación *JAK2*, *CALR* o *MPL*

Criterios Menores:

1. Presencia de un marcador clonal (ej: cariotipo anormal) o ausencia de evidencia de trombocitosis reactiva
-

El diagnóstico de TE comporta el cumplimiento de los cuatro criterios mayores o bien los tres primeros criterios mayores y el criterio menor.

1.2.2.4. Evolución

La historia natural de la TE demuestra que entre un 0,8 y un 9,3% de los pacientes pueden evolucionar a mielofibrosis post-trombocitémica (MF post-TE) ^{44,45} y en un 2-5% de pacientes se puede observar la aparición de un fenotipo clínico-biológico indistinguible de una PV durante la evolución de la enfermedad. La transformación aguda es infrecuente y en series retrospectivas se ha descrito en un 3-5% de los pacientes a los 10-15 años. La utilización secuencial de más de un agente citorreductor se ha relacionado con el aumento del riesgo de transformación.

Los criterios diagnósticos sugeridos para el diagnóstico de la MF post-TE según el *IWG-MRT* ²⁶ se recogen en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Criterios diagnósticos para la Mielofibrosis post-Trombocitémica según el IWG-MRT

Criterios requeridos

1. Documentación de un diagnóstico previo de TE definido según los criterios de la OMS ²⁷
 2. Fibrosis medular grado 2-3 (en escala 0-3) ²⁸ o grado 3-4 (en escala 0-4) ^{a 29}
-

Criterios adicionales (se requieren dos criterios)

1. Anemia ^b o un ≥ 2 mg mL⁻¹ descenso de los niveles de hemoglobina respecto a la línea basal
 2. Características leucoeritroblásticas en sangre periférica
 3. Aumento de esplenomegalia de ≥ 5 cm (distancia de la punta del bazo a partir del margen costal izquierdo) o la aparición de nueva esplenomegalia palpable
 4. Aumento de la LDH (por encima del nivel de referencia)
 5. Desarrollo de ≥ 1 de tres síntomas constitucionales: > 10% de pérdida de peso en 6 meses, sudores nocturnos o fiebre inexplicable (> 37,5°C)
-

LDH: lactato deshidrogenasa

a Grado 2-3 según la clasificación europea ²⁸:difuso, con frecuencia trama de reticulina densa con o sin fibrosis colágena (en caso de existir fibrosis colágena ésta es positiva en la tinción de tricrómico) .Grado 3-4 según la clasificación estándar ²⁹ aumento difuso y denso de la trama de reticulina densa con fibrosis colágena focal y/o osteoesclerosis focal o con incrementos significativos de fibrosis colágena frecuentemente asociados a osteoesclerosis significativa

b Por debajo del rango de referencia apropiado a la edad, sexo y altura

1.2.2.5. Pronóstico

Los estudios clínicos retrospectivos sugieren que la esperanza de vida en los pacientes con TE no es sustancialmente diferente a la de la población control ⁴⁶. El estudio de Passamonti y *col.* sobre 435 pacientes indica que la supervivencia a los 15 años es del 73%, y que una historia de trombosis es el principal factor pronóstico de supervivencia. Además, este estudio registra un riesgo acumulado de trombosis, leucemia aguda mieloide y mielofibrosis post-trombocitémica a los 15 años del 17%, 2% y 4%, respectivamente ⁴⁷.

1.2.2.6. Tratamiento

El objetivo del tratamiento de la TE es prevenir el riesgo de trombosis y hemorragia sin incrementar el riesgo de transformación a mielofibrosis o leucemia aguda.

Hidroxiurea. La hidroxiurea es el quimioterápico de elección por su facilidad de uso, predictibilidad de acción y escasa capacidad mutagénica. Este fármaco demostró ser efectivo en la prevención de complicaciones trombóticas en los pacientes de alto riesgo cuando se comparó en un ensayo aleatorizado a la rama de los pacientes que no recibieron tratamiento citorreductor ⁴⁸. Por otra parte, el estudio inglés PT-1 que comparó, de forma aleatorizada, hidroxiurea más dosis bajas de AAS con anagrelida más dosis bajas de AAS, demostró que HU más AAS era superior a anagrelida más AAS respecto a la reducción del riesgo de trombosis arterial, sangrado grave y progresión fibrótica ⁴⁹. El estudio ANAHYDRET comparó también, de forma aleatorizada, anagrelida con HU en pacientes con TE de alto riesgo diagnosticados de acuerdo con los criterios histomorfológicos de la OMS. Los resultados no fueron significativamente diferentes respecto a las complicaciones trombóticas y hemorrágicas observadas en cada brazo de tratamiento ⁵⁰.

Interferón. El IFN ha demostrado ser una posible opción de citorreducción no quimioterápica en la TE. A pesar de que es un tratamiento sin efectos mutágenos ni leucemógenos, su elevado coste y sus efectos secundarios determinan que un 20-50% de pacientes suspendan el tratamiento. Un 5-13% de pacientes con TE tratados con formas pegiladas de interferón consiguen una remisión molecular completa. No se recomienda en pacientes de edad avanzada y su principal indicación es en mujeres embarazadas dada la ausencia de efecto teratógeno y en los pacientes resistentes a anagrelida o hidroxiurea.

Anagrelida. La Ag es un fármaco que pertenece a la familia de las imidazoquinazolinas y actúa interfiriendo en la maduración megacariocítica, disminuyendo la ploidía y el tamaño celular. Aproximadamente, dos tercios de los pacientes refractarios a la hidroxiurea responden a la anagrelida ⁵¹. Los principales efectos secundarios son cardiovasculares y derivan del efecto vasodilatador periférico e inotrópico positivo, con lo cual su uso está contraindicado en pacientes con historia de cardiopatía. En Europa, anagrelida está indicada como segunda línea de tratamiento en los pacientes con TE que son resistentes o intolerantes a la primera línea de tratamiento citorreductor (generalmente HU) ⁵².

Antiagregantes plaquetarios. La administración de dosis bajas de AAS es práctica común en la mayoría de pacientes con TE. En los pacientes de alto riesgo se administra como profilaxis antitrombótica secundaria en todos los pacientes que han presentado trombosis arterial. En los pacientes de bajo riesgo su administración beneficia a pacientes JAK2V617F positivos y/o con factores de riesgo cardiovascular⁵³. En pacientes con historia de hemorragia o trombocitosis $>1000-1500 \times 10^9/L$ se halla contraindicado por la posibilidad de aparición de sangrado debido a un von Willebrand adquirido.

1.2.3. Mielofibrosis Primaria

1.2.3.1. Etiopatogenia

La mielofibrosis primaria (MFP) también conocida como mielofibrosis con metaplasia mieloide o metaplasia mieloide agnogénica es una neoplasia mieloproliferativa caracterizada por la proliferación de megacariocitos displásicos, fibrosis intensa en médula ósea, hematopoyesis extramedular y síndrome leucoeritroblástico en sangre periférica. La fibrosis es secundaria a la proliferación clonal de una célula madre pluripotencial de la hematopoyesis⁵⁴. La proliferación fibroblástica de la médula ósea se debe a la liberación intramedular del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) producido por los megacariocitos y almacenada en los gránulos alfa de las plaquetas⁵⁵. Estudios más recientes indican que otras citocinas como el TGF- β que regula la síntesis de la matriz extracelular, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la calmodulina que actúa como mitógeno para los fibroblastos también podrían tener un papel en la aparición de fibrosis⁵⁶⁻⁵⁸.

1.2.3.2. Características clínicas

La MFP presenta una incidencia de 0,5-0,7 casos por 100.000 habitantes y año. La mediana de edad al diagnóstico es de 65 años y una tercera parte de los pacientes están asintomáticos en el momento del diagnóstico⁵⁹.

En los pacientes con MFP, la sintomatología suele ser de inicio insidioso y reconoce tres orígenes fundamentales: la anemia, el estadio de hipermetabolismo y la esplenomegalia⁶⁰. La esplenomegalia se halla presente en el 80% de pacientes y es masiva en el 10% de los casos. También puede existir una tendencia al sangrado, en relación con la plaquetopenia o la disfunción plaquetar, y tampoco son raros el prurito y las complicaciones trombóticas, arteriales o venosas, entre las cuales se incluyen las que afectan a los vasos del eje esplenoportal.

1.2.3.3. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de MFP se basa en los criterios diagnósticos de la OMS (2008) y se requiere la presencia de todos los criterios mayores y al menos de dos de los criterios menores (Tabla 9)

Tabla 9: Criterios diagnósticos de la Mielofibrosis Primaria según la clasificación de la OMS 2008

Criterios mayores

1. Presencia de proliferación megacariocítica y atípica ^a, normalmente acompañada por fibrosis reticulínica y/o colágena
 - en ausencia de una fibrosis reticulínica significativa, los cambios en los megacariocitos deben ir acompañados por un incremento de la celularidad en médula ósea, proliferación granulocítica y, a menudo, disminución de la eritropoyesis
 2. No cumplir los criterios de PV ^b, LMC *BCR-ABL1* positiva ^c, SMD u otra neoplasia mieloide, según la OMS
 3. Demostración de la mutación JAK2V617F o de otro marcador de clonalidad (ej. Mutación en *MPL*)
 - en ausencia de marcador de clonalidad, que no haya evidencia de que la fibrosis en médula ósea u otros cambios sean secundarios a una infección, un desorden autoinmune u otras situaciones inflamatorias crónicas, tricoleuceemias u otra neoplasia linfoide, enfermedad metastásica o miopatías tóxicas (crónicas) ^d
-

Criterios menores

1. Síndrome leucoeritroblástico
 2. Aumento de las concentraciones séricas de la LDH
 3. Anemia
 4. Esplenomegalia palpable
-

a Megacariocitos de pequeño a gran tamaño con una relación núcleo/citoplasma aberrante, núcleos hiper cromáticos y de aspecto irregular y agrupaciones densas

b Requiere el fracaso a la terapia de reposición del hierro para incrementar los niveles de hemoglobina al rango de PV en presencia de una disminución de la ferritina en suero. Exclusión de la PV en base a los niveles de hemoglobina y el hematocrito. No se requiere la medición de la masa eritrocitaria

c Requiere la ausencia del gen de fusión *BCR-ABL1*

d Requiere la ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis

e Los pacientes con condiciones asociadas con mielofibrosis reactiva no son inmunes a la MFP y el diagnóstico se debería considerar en esos casos si se detectan otros criterios

f El grado de anormalidad puede estar en el límite de la normalidad o puede ser marcado

La nueva propuesta de criterios diagnóstico para la MFP que modifican los actuales criterios de la clasificación actual de 2008 son los mostrados en la **Tabla 10**²⁴.

Tabla 10: Propuesta de criterios diagnósticos revisados para el diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria según la clasificación de la OMS

Criterios Mayores:

1. Proliferación megacariocítica y atipia acompañada por reticulina y/o fibrosis colágeno^b
 2. No cumplir los criterios de la OMS para el diagnóstico de LMC, PV, TE, SMD u otra neoplasia mieloproliferativa
 3. Presencia de la mutación *JAK2*, *CALR* o *MPL*
-

Criterios Menores:

1. Presencia de un marcador clonal (ej: cariotipo anormal) o ausencia de evidencia de fibrosis reactiva en médula ósea
 2. Presencia de anemia o esplenomegalia palpable
 3. Presencia de leucoeritroblastosis o LDH aumentada^c
-

a Megacariocitos de pequeño a gran tamaño con una relación núcleo/citoplasma aberrante, núcleos hiper cromáticos y de aspecto irregular y agrupaciones densas

b En ausencia de fibrosis de reticulina, los cambios en los megacariocitos deben ir acompañados de un incremento de la celularidad en médula ósea, proliferación granulocítica y frecuente disminución de eritropoyesis (MF pre-fibrótica)

c El grado de anormalidad se puede limitar o marcar y se deberían utilizar rangos de referencia institucionales para los niveles de LDH

El diagnóstico de MFP implica el cumplimiento de los tres criterios mayores o bien los dos primeros criterios mayores y los tres criterios menores.

1.2.3.4. Evolución y pronóstico

La mediana de supervivencia de los pacientes con MFP es de 6-7 años. En la actualidad se utilizan diversos sistemas pronósticos de supervivencia: el IPSS, DIPSS y DIPSS-Plus⁶¹⁻⁶³. Aparte de las características clínico-biológicas que constituyen la base de los diferentes sistemas pronósticos, recientemente se ha demostrado el significado pronóstico favorable de las mutaciones de *CALR* y adverso de las mutaciones *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* y *SRSF2* y de los denominados casos triple-negativos⁶⁴⁻⁶⁶.

Las principales causas de fallecimiento son la transformación leucémica, la progresión de la enfermedad, infecciones, hemorragia, fenómenos tromboembólicos, insuficiencia cardíaca e hipertensión portal ⁶⁷.

1.2.3.5. Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con MFP está dirigido a los síntomas que presenta el paciente y es fundamentalmente paliativo, a excepción de aquellos pacientes de riesgo intermedio-2 o alto con donante histocompatible en los que el trasplante alogénico constituye la única opción curativa de la enfermedad. El tratamiento de la anemia se realiza con eritropoyetina en los pacientes con niveles basales inapropiados y, en caso de fracaso a los agentes eritropoyéticos, con danazol. En los pacientes con manifestaciones proliferativas la hidroxiurea es el fármaco de elección. Los corticoides son útiles para mejorar la anemia en pacientes con alteraciones inmunológicas asociadas y la esplenectomía puede considerarse en pacientes muy seleccionados con esplenomegalia sintomática o citopenias refractarias a otras terapéuticas. Los inmunomoduladores como talidomida o lenalidomida pueden ser útiles en algunos pacientes.

Los inhibidores de JAK2 son muy eficaces para controlar las manifestaciones constitucionales de la enfermedad. Su acción es manifiesta tanto en pacientes con mutación en *JAK2* como en pacientes sin mutaciones en *JAK2*. Ruxolitinib (anti JAK1 y anti JAK2) es el único inhibidor de JAK aprobado para el tratamiento de los pacientes con esplenomegalia sintomática y/o síntomas constitucionales. Recientemente, se ha descrito un posible aumento de la supervivencia de los pacientes tratados con ruxolitinib, aunque este fármaco no revierte la fibrosis y disminuye escasamente la carga alélica de JAK2V617F ⁶⁸.

1.3. BIOMARCADORES DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Históricamente, el progreso en el conocimiento de las NM se ha producido por el descubrimiento de diversos marcadores biológicos. A continuación, se describen de forma cronológica los diferentes biomarcadores asociados a las NM.

1.3.1. Cultivos de progenitores hematopoyéticos

Una característica común a la PV, TE y MFP es la independencia o la hipersensibilidad de los progenitores hematopoyéticos a numerosas citocinas, como la EPO, que produce crecimiento de progenitores *in vitro* en ausencia de citocinas, en el proceso conocido como crecimiento endógeno de colonias eritroides (EEC). Esta hipersensibilidad no se restringe únicamente a la EPO sino también a otras citocinas como la interleucina-3 (IL-3), el *stem cell factor* (SCF), el *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), el FEC-GM y la TPO. El EEC se observa en casi el 100% de las PV y entre el 30-50% de las TE y MFP ⁶⁹.

No se ha observado crecimiento endógeno ni hipersensibilidad a citocinas en progenitores hematopoyéticos de individuos sanos o en pacientes con trombocitosis reactivas o eritrocitosis secundarias, por lo que la detección de crecimiento endógeno es altamente sugestiva de una neoplasia mieloproliferativa ⁶⁹.

1.3.2. Alteraciones cromosómicas

Se han descrito distintas alteraciones cromosómicas en pacientes con NM pero ninguna de estas alteraciones presenta una asociación específica. Alteraciones citogenéticas como la delección del brazo largo del cromosoma 20 (del(20q)) y del cromosoma 13 (del(13q)), las trisomías 8 y 9 y la duplicación de segmentos de 1q, son alteraciones que se han detectado en el momento del diagnóstico de una NM, sugiriendo que pueden ser alteraciones tempranas implicadas en la patogenia de la enfermedad. Alrededor de un 33-43% de las MFP, un 10-15% de las PV y un 5% de las TE presentan una alteración cromosómica en el momento del diagnóstico. Las alteraciones más frecuentes en la PV son la trisomía 8 y 9 y la delección del brazo largo del cromosoma 20 (del(20q)). En la MFP, las alteraciones más frecuentes son tanto la delección del(20q) como la delección del cromosoma 13 (del(13q)), las trisomías 8 y 9, y trisomías parciales de 1q. Finalmente, en la TE, donde las alteraciones citogenéticas son infrecuentes, las alteraciones que se

suelen detectar son las trisomías 8 y 9 y la deleción del(13q) (Tabla 11). Aunque estas son las alteraciones más frecuentes en las NM Ph-negativas clásicas, se han descrito otras alteraciones que pueden afectar a cualquier otro cromosoma, aunque se detectan con menor frecuencia. Varios estudios indican que la presencia de alteraciones citogenéticas en el momento del diagnóstico no se asocian a una menor supervivencia o mayor riesgo de transformación a leucemia aguda (LA) o a mielofibrosis (MF) secundaria. Aun así, estudios citogenéticos durante el curso de la enfermedad pueden ser de utilidad ya que las transformaciones leucémicas se caracterizan por una evolución clonal en la que se adquieren nuevas alteraciones citogenéticas⁷⁰⁻⁷⁴.

Tabla 11: Alteraciones citogenéticas más frecuentes en las NM

Entidad	Alteraciones citogenéticas
LMC	t(9;22)(q34;q11)
PV	+8,+9, del(20q), del(13q),del(1p)
TE	+8,+9, del(13q)
MFP	del(13q),del(20q), +8,+9, trisomía parcial 1q, -7/7q-, 5q-
LNC	+8,+9, del(20q)
LES/SHE	+8, i(17q)
NM inclasificables	+8,+9, del(20q)

1.3.3. Estudios de clonalidad mieloide

Como se ha mencionado, las NM son enfermedades clonales que afectan a una célula madre hematopoyética multipotente. Los primeros estudios que sugirieron este concepto estaban basados en el análisis del patrón de inactivación de uno de los dos cromosomas X (PICX).

Durante la embriogénesis femenina se produce el fenómeno de Lyonización, que consiste en la inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X mediante metilación de las islas CpG localizadas en las regiones promotoras de distintos genes. Una vez

fijada, la inactivación de uno de los dos cromosomas X se mantiene estable y la descendencia de cada célula heredará el mismo cromosoma X inactivo en cada futura ronda de mitosis. Como la inactivación del cromosoma X se produce al azar, la inactivación de cada uno de los cromosomas X (materno y paterno) debería ser del 50%, pero como este fenómeno se da en las primeras fases de la embriogénesis, cuando existen pocas células, se acepta como normalidad una proporción de inactivación entre los dos cromosomas X del 75:25. Cuando una célula se vuelve neoplásica, todas las células derivadas de dicha célula neoplásica original tendrán el mismo cromosoma X inactivado con lo cual, se observará un desequilibrio en el patrón de inactivación en una proporción superior al 75:25 (Figura 3).

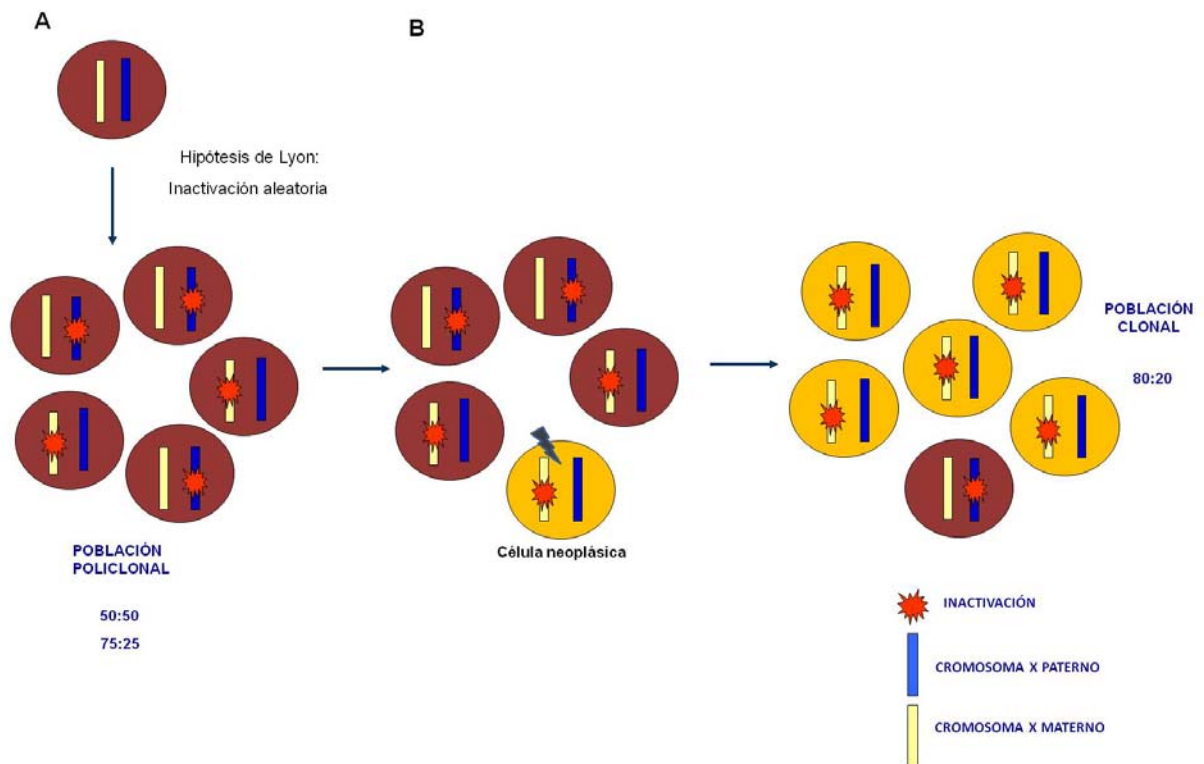


Figura 3: Esquema del patrón de inactivación del cromosoma X (PICX) durante la embriogénesis femenina según la hipótesis de Lyon (A). Desequilibrio del PICX durante un proceso neoplásico (B).

Dado que este tipo de análisis se basa en la inactivación de uno de los dos cromosomas X, estos estudios se pueden realizar únicamente en mujeres. Para estudiar la clonalidad en base al proceso de *lyonización* es necesario estudiar genes polimórficos que estén localizados en el cromosoma X y que estén sujetos al fenómeno de inactivación

mediante metilación. Uno de los primeros análisis para el estudio de la clonalidad mieloide fue el estudio de las isoformas de la G6PD. Dada su baja heterocigosidad (30%) se empezaron a realizar otros análisis a nivel del ADN analizando otros genes como la fosfoglicerato cinasa (*PGK*) o la hipoxantina fosforribosiltransferasa (*HPRT*) que presentan, en ambos casos, una heterocigosidad del 30-50%. Posteriormente se estudió el gen *HUMARA*, que ha sido uno de los genes más frecuentemente utilizados para el estudio de la clonalidad mieloide dada su alta heterocigosidad (83-90%). También se ha estudiado la clonalidad mieloide mediante el análisis de polimorfismos exónicos de genes como la iduronato-2-sulfatasa (*IDS*), la proteína de membrana MPP1 (*MPP1* o *p55*), la bruton tirosina cinasa (*BTK*) o la G6PD, a partir del ácido ribonucleico (ARN) de granulocitos y plaquetas.

Existen varias metodologías para realizar este tipo de análisis con lo que la interpretación es distinta en cada caso. En general, el objetivo es identificar si existe un sesgo en el patrón de metilación entre los dos cromosomas X. En las técnicas que permiten cuantificar las diferencias de metilación entre el cromosoma X activo e inactivo, desequilibrios de metilación superiores a una ratio de 75:25 se consideran patrones clonales.

Alrededor del 73% de las PV y entre un 18-70% de las TE presentan una hematopoyesis clonal⁷⁵⁻⁸¹. En ausencia de otro marcador de clonalidad, la determinación de la clonalidad mieloide puede ser de utilidad diagnóstica para establecer un origen neoplásico en las mujeres con sospecha de TE. Aun así, se ha demostrado que este tipo de análisis debe interpretarse de forma cuidadosa en ciertos casos ya que varios estudios han reportado que, aproximadamente, un 23-39% de las mujeres hematológicamente normales y mayores de 60 años, pueden presentar desequilibrio en los PICX (particularmente en granulocitos), sugiriendo la presencia de hematopoyesis clonal sin que exista una neoplasia mieloide^{75,82}. Este hecho se puede atribuir a la depleción de células madre o bien a presiones selectivas, aunque algunos estudios como el de Swierczek *y col.* sugieren que estos resultados se podrían atribuir a un problema técnico en el ensayo del gen *HUMARA*⁸³. En este último estudio, evaluaron el PICX mediante una nueva técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aleloespecífica con la que miden la expresión aleloespecífica y no la metilación aleloespecífica de varios genes que presentan polimorfismos exónicos como *IDS*, *p55*, *BTK*, *G6PD* y el *FHL1*. Con este ensayo molecular, no detectaron clonalidad en ninguna de las 40 mujeres sanas analizadas con edades comprendidas entre 65-92 años. Sin embargo, utilizando el análisis del gen *HUMARA*, un 30% de los casos presentaban

hematopoyesis clonal, indicando que el gen *HUMARA* no es el mejor marcador a estudiar en mujeres de edad avanzada. Este sigue siendo un aspecto controvertido ya que otros estudios demostraron clonalidad mieloide en un 40% de mujeres sanas utilizando tanto la nueva técnica (analizando la expresión de polimorfismos exónicos) como mediante el análisis del gen *HUMARA*⁸⁴.

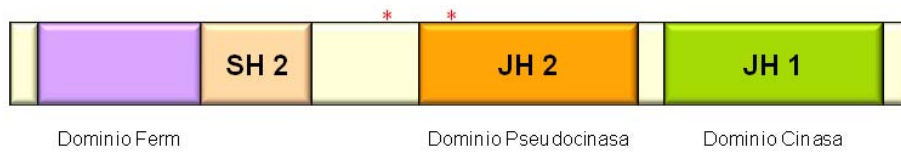
1.3.4. Alteraciones moleculares

1.3.4.1. JAK2

JAK2 es una tirosina cinasa que pertenece a la familia de las Janus cinasas (JAKs) que incluye además a JAK1, JAK3 y TYK2⁸⁵⁻⁸⁷ y está codificada por el gen *JAK2* localizado en el cromosoma 9p24.

Las proteínas JAKs se caracterizan por la presencia de siete regiones con secuencias similares presentes en los distintos miembros de la familia JAK, conocidos como dominios de homología de JAK (JH). La estructura de los distintos dominios funcionales consiste en un dominio N-terminal FERM (*band 4.1, ezrin, radixin, moesin*) (JH4-JH7), un dominio *Src homology-2(SH2)-like* (JH3-JH4), un dominio pseudocinasa (JH2) y un dominio tirosina cinasa en C-terminal (JH1). Estudios bioquímicos han determinado que el dominio FERM es responsable de la asociación de las proteínas JAK a los receptores de citocinas. El dominio *SH2-like* no parece tener la función convencional de un dominio de unión a fosfotirosina y su función exacta está por determinar. El dominio JH1, es el dominio cinasa que se activa vía trasfosforilación de tirosinas en tándem localizadas en el *loop* de activación. Finalmente, el dominio JH2 es un dominio que carece de actividad cinasa (dominio pseudocinasa) y que se encarga de regular negativamente el dominio JH1⁸⁸⁻⁹¹ (Figura 4).

JAK2 (9p24)



* Localización de las mutaciones más frecuentes

Figura 4: Estructura del gen JAK2 y localización de las mutaciones más frecuentes

La proteína JAK2 está implicada en vías de señalización activadas por distintos receptores de citocinas tipo I u hormonas de crecimiento incluyendo los receptores de las interleucinas IL3, IL5, la EPO, el FEC-GM, el FEC-G y la TPO ⁹² (Figura 5). La unión del ligando provoca la dimerización de los receptores cuyo dominio citoplasmático está físicamente asociado a JAK2. La dimerización de los receptores hace que las moléculas JAK2 estén más próximas entre sí de manera que se pueden fosforilar la una a la otra (transfosforilación) y fosforilar al receptor.

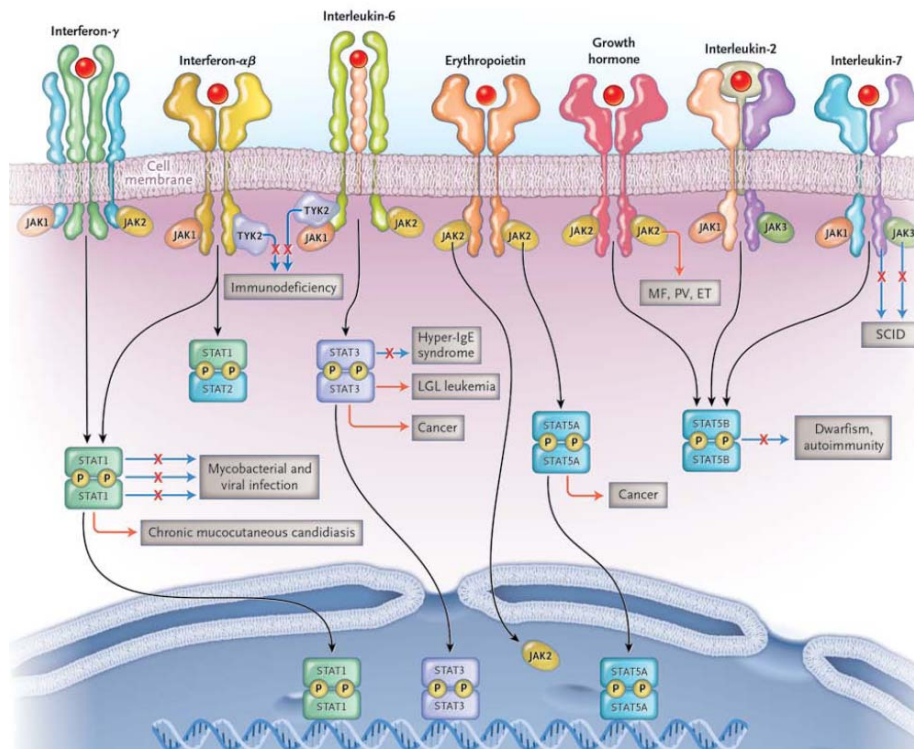


Figura 5: Vías de señalización activadas por distintas citocinas (O'Shea y col., 2013⁹³)

El complejo JAK-receptor activado lleva al reclutamiento y fosforilación de moléculas sustratos como los factores de transcripción STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Las moléculas STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) son claves en la vía de transducción de las proteínas JAKs y utilizan su dominio SH2 para interactuar con las fosfotirosinas del receptor. Tras su activación (mediante fosforilación), las proteínas STATs dimerizan y se translocan al núcleo para interactuar con elementos reguladores específicos e inducir la transcripción de sus genes diana^{94,95}.

Los mecanismos de regulación de la vía de señalización de JAK2 incluyen, entre otros, la defosforilación directa de JAK2 mediante una proteína tirosina fosfatasa específica (SHP-1), la degradación proteolítica de JAK2 a través de la unión de proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) e inhibición de la unión de STAT al ADN mediante proteínas inhibidoras de la actividad STAT (*Protein Inhibitor of Activated STAT*, PIAS)⁹⁶⁻⁹⁹.

La vía de señalización JAK-STAT es esencial para el desarrollo de las células mieloides, para la proliferación y supervivencia celular y también es necesaria en los estadios iniciales de la respuesta inmune ¹⁰⁰. Por estos motivos, las alteraciones en esta vía pueden tener un papel importante en el desarrollo de las NM.

Hasta el momento, se ha descrito el papel de JAK2 como tirosina cinasa implicada en la vía JAK-STAT, pero JAK2 también tiene un papel epigenético a nivel nuclear influenciando sobre la estructura de la cromatina y la metilación del ADN ^{101,102}. En las células hematopoyéticas, JAK2 fosforila la histona H3Y41 y bloquea el reclutamiento de la proteína de la heterocromatina 1 alfa (HP1 α) permitiendo una sobreexpresión de varios genes entre los que se encuentra el oncogen *LMO2* ¹⁰². Además, JAK2 también interacciona con la metiltransfera PRMT5 (*Protein Arginine Methyltransferase 5*) ^{101,102} (Figura 6).

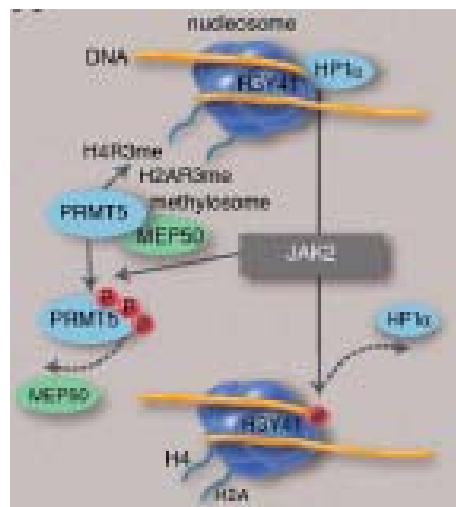


Figura 6: Papel epigenético de JAK2 (Vainchenker y col., 2011 ¹⁰³)

1.3.4.1.1. Mutación JAK2V617F

En el año 2005 cinco grupos independientes identificaron la mutación p.V617F en el exón 14 del gen *JAK2*. Esta alteración consiste en una transversión de una guanina a una timina (G>T) en la posición nucleotídica 1849 del gen *JAK2*. Como consecuencia de este cambio, el aminoácido valina (GTC), que ocupa el residuo 617, se sustituye por una fenilalanina (TTC). La mutación JAK2V617F está presente en un 95% de las PV y en un 60% de las TE y MF, además de en otras neoplasias mieloides como en neoplasias mieloides inclasificables, en leucemias agudas mieloides (LAM), leucemias mielomonocíticas crónicas (LMMC), síndromes mielodisplásicos (SMD) o síndromes hipereosinofílicos (SHE), aunque en menor frecuencia. Por el contrario, no se ha detectado esta mutación en neoplasias linfoides^{86,104,105}.

La mutación p.V617F de *JAK2* se localiza en el dominio pseudocinasa JH2 y como consecuencia de la misma, no se produce la inhibición del dominio cinasa (JH1), lo que resulta en una activación constitutiva de la proteína *JAK2* en ausencia de la unión del ligando al receptor. Se trata, por tanto, de una mutación que provoca una ganancia de función, es decir, una activación permanente de diferentes vías de transducción de señales implicadas en la señalización de los receptores de citocinas de tipo I (EPO, FEC-G, TPO) como la activación de las vías JAK-STAT, PI3K-AKT y MAPK-ERK^{15,106-111} (Figura 7).

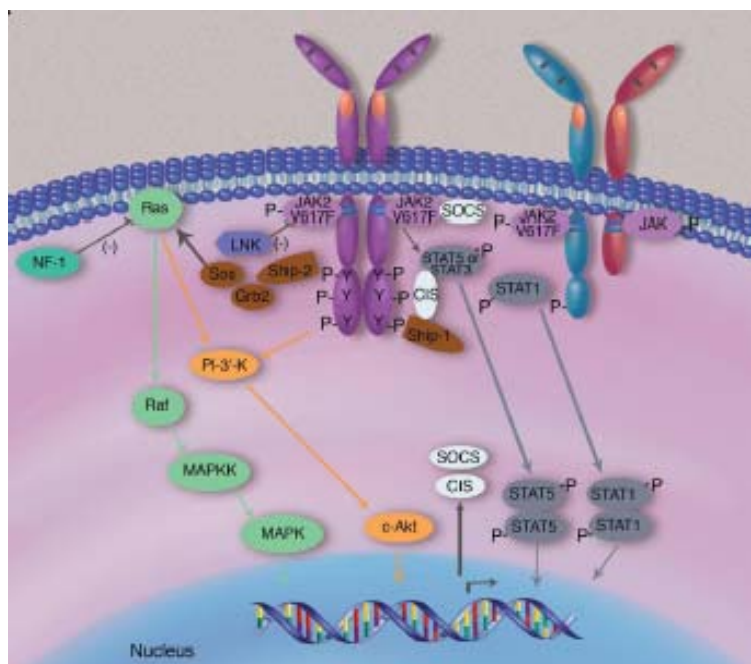


Figura 7: Vías de señalización implicadas en la patología de las NM (Vainchenker y col., 2011¹⁰³)

Las mutaciones de *JAK2* también tienen consecuencias a nivel nuclear. Se ha descrito que si *JAK2* presenta las mutaciones p.V617F (exón 14) o p.K539L (exón 12) (de la que se hablará en el siguiente apartado) interacciona y fosforila con mayor afinidad a la metiltransferasa PRMT5 que la forma no mutada. Esta fosforilación altera la interacción de PRMT5 y su cofactor MEP50 provocando una disminución de su actividad metiltransferasa, impidiendo la metilación de las histonas H2A y H4 en residuos de arginina específicos¹¹².

Estudios *in vivo* en los que se trasplantaron ratones con progenitores hematopoyéticos portadores de la mutación *JAK2V617F* mostraron que estos animales desarrollaban un cuadro clínico similar a los de la PV con eritrocitosis, leucocitosis, fibrosis medular y hematopoyesis extramedular, pero no trombocitosis^{107,113,114}.

La mutación de *JAK2V617F* es una mutación adquirida ya que no está presente en línea germinal. El análisis de la mutación *JAK2V617F* en colonias de cultivos de progenitores hematopoyéticos *in vitro*¹¹⁵ y en estudios en los que aíslan células CD34+ de los pacientes con NM, ha demostrado que la mutación afecta a una célula hematopoyética

multipotente lo cual explicaría que se puedan ver afectadas las distintas líneas mieloides ¹¹⁶. Además, algunos estudios demuestran que la alteración también puede afectar a una célula más temprana en la hematopoyesis (un progenitor linfomieloide) ya que en ocasiones también se ha podido detectar la mutación en linfocitos B, T y NK de pacientes con PV y MFP ¹¹⁷.

Otros estudios *in vitro* a partir de colonias de cultivos de progenitores hematopoyéticos han mostrado que alrededor de un 30% de los pacientes con PV son homocigotos para la mutación JAK2V617F, considerando que los alelos mutados superan el 50%. Cuando se analiza el genotipo de colonias obtenidas a partir de cultivos de progenitores hematopoyéticos se observa que el 90% de los pacientes con PV presentan colonias homocigotas mientras que esto no suele ocurrir en pacientes con TE ^{115,118}. El estado homocigoto de JAK2V617F es, por tanto, más característico de la PV y se produce, principalmente, por un proceso de recombinación mitótica, ya que un porcentaje similar de pacientes presentan LOH del cromosoma 9 ^{14,15,106,119}.

El hecho de que una única mutación pueda dar lugar a varios fenotipos distintos podría explicarse de distintas maneras. Una hipótesis es la de que el estadio de la hematopoyesis en el que se adquiere la mutación oncogénica, así como la carga alélica en la que está presente la alteración en estas células, influye en el fenotipo de la enfermedad que se va a desarrollar ¹²⁰. Otra posible explicación es que existan otras alteraciones que sean más específicas de cada una de las distintas entidades. Varios estudios dan soporte a esta hipótesis en la que la mutación de *JAK2* parece no ser la causante del desarrollo de la NM sino que, posiblemente, exista otra alteración que sea la responsable del desarrollo de la NM y la mutación de *JAK2* sea un evento más tardío responsable de la progresión y del fenotipo de la enfermedad ^{121,122}. Otros estudios sugieren que la carga de mutación JAK2V617F y, por tanto, la potencia de la señalización de *JAK2* es importante para el fenotipo de la NM desarrollada, donde una elevada carga mutacional daría lugar a un fenotipo de PV o MF mientras que bajas cargas alélicas se asociarían al desarrollo de TE ^{115,123}. Finalmente, en el estudio de Chen y *col.*, muestran una activación de la vía del interferón y de los niveles de fosforilación de STAT1 distinta entre los pacientes con TE y PV. Este estudio demuestra que en la TE, STAT1 está activada en asociación con JAK2V617F pero que esto no ocurre en la PV. Por lo tanto, sugieren que los niveles de pSTAT1 son un marcador molecular que distingue estas dos entidades, donde una elevada actividad de STAT1 provoca un fenotipo tipo TE con una diferenciación megacariocítica favorecida y una diferenciación eritroide disminuida ¹²⁴.

1.3.4.1.2. Mutaciones en el exón 12 de JAK2

La mayoría de los pacientes con PV que carecen de la mutación JAK2V617F presentan alteraciones en el exón 12 de JAK2. Las mutaciones en el exón 12 se localizan en la región adyacente al inicio del dominio pseudocinasa y afectan, principalmente, a la región comprendida entre los amino ácidos 536 y 547. A diferencia de la mutación p.V617F las mutaciones en el exón 12 incluyen distintos tipos de alteraciones: inserciones, deleciones y sustituciones. Hasta la fecha, se han reportado hasta 37 alteraciones diferentes entre las cuales se incluyen 11 sustituciones no sinónimas, 20 deleciones y 6 duplicaciones. Las alteraciones que se detectan con mayor frecuencia son la p.N542_E543del (23%), p.E543_D544del (11%), p.F537_K539delinsL (10%), p.K539L (10%) y p.R541_E543delinsK (8%)¹²⁵. Por lo general, estas mutaciones se presentan con un patrón heterocigoto y, excepcionalmente, en homocigosis, sugiriendo que la recombinación mitótica es un evento más característico de las PV JAK2V617F positivas y no tanto de las PV JAK2 exón 12 positivas¹²⁶⁻¹²⁹.

Las mutaciones en el exón 12 de JAK2 se detectan esencialmente en pacientes con PV JAK2V617F negativos o con eritrocitosis idiopática, pero también se han detectado en pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (RARS-T)¹³⁰, aunque su frecuencia real está por determinar. Por el contrario, no se han detectado mutaciones en otras patologías como en la leucemia aguda linfocítica Ph positiva, LMC, en pacientes con linfoma primario mediastínico de célula B grande o en LAM *de novo*^{131,132}.

Algunos estudios han reportado pacientes con PV con coexistencia de la mutación p.V617F junto con una mutación en el exón 12 de JAK2. El genotipado de las colonias derivadas de los cultivos de progenitores demostró que las mutaciones se encontraban en clonas distintas, sugiriendo que cada alteración era un evento independiente, adquirido a partir de un clon fundador pre-existente o bien, que cada alteración se habría adquirido en una célula madre hematopoyética diferente^{133,134}.

Las mutaciones en el exón 12 también activan de forma constitutiva las vías de señalización activadas por JAK2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se transfectan las células BaF3/EpoR con distintas mutaciones y en ausencia de eritropoyetina, se observa un mayor incremento en los niveles de fosforilación de JAK2 y STAT5 en comparación con las células portadoras de la mutación JAK2V617F. Las mutaciones en el exón 12

también activan de forma constitutiva la vía de Ras-Erk provocando niveles de fosforilación de Erk1 y Erk2 mucho más elevados que los obtenidos con JAK2 no mutada e incluso con JAK2V617F¹³⁵.

En modelos murinos en los que se transfectaron células con la mutación JAK2K539L (exón 12), los ratones desarrollaron un hematocrito elevado, reticulocitosis, leucocitosis y modesta trombocitosis. De forma similar a lo observado en los fenotipos humanos, los ratones en los que se transfectaban las células JAK2K539L positivas presentaban niveles de plaquetas y de leucocitos inferiores a los observados en los ratones a los que se les transfectaron células JAK2V617F positivas¹³⁵.

La mayoría de los pacientes con PV JAK2V617F presentan EEC y lo mismo ocurre con los pacientes con mutaciones en el exón 12 aunque el perfil genotípico de las colonias individuales es diferente entre los distintos grupos de pacientes. Mientras que los pacientes con PV JAK2V617F positivos presentan una proporción variable de colonias homocigotas¹¹⁵, este hecho es infrecuente en pacientes con mutaciones en el exón 12 en los que la mayoría de las colonias son heterocigotas^{127,134,135}. Aun así, en algunos pacientes también se han descrito colonias homocigotas, ya sea debido a un proceso de recombinación mitótica o bien por la adquisición de la mutación en un segundo alelo.

Estos resultados sugieren que la activación de la vía de señalización de JAK2 es mayor en los casos con mutaciones en el exón 12 y que, por tanto, presentar la mutación en el exón 12 en heterocigosis o la mutación p.V617F en homocigosis conlleva a desarrollar una eritrocitosis pronunciada, mientras que un patrón de la mutación p.V617F en heterocigosis conllevaría un patrón más trombocitémico^{115,136}.

Características clínico hematológicas de los pacientes con mutaciones en el exón 12 de JAK2

Los pacientes con PV con mutaciones en el exón 12 presentan algunas características clínico hematológicas diferentes a las que presentan los pacientes con PV JAK2V617F positivos. Aunque en general no se han observado diferencias en género, sí que hay varios estudios que reportan que los pacientes con mutaciones en el exón 12 de JAK2 son más jóvenes que los pacientes con la alteración p.V617F. Los pacientes exón 12 positivos presentan eritrocitosis absoluta aislada pero no suelen presentar afectación de trilineaje (eritrocitosis, leucocitosis y trombocitosis) algo más característico de los pacientes JAK2V617F positivos. Así mismo, presentan una media de los niveles de

hemoglobina y hematocrito mayores que los pacientes con la mutación JAK2V617F. La mayoría de los pacientes presentan niveles de leucocitos y plaquetas normales aunque alrededor de un 25% de los casos sí presentan estos parámetros elevados. En cuanto a los niveles de EPO, los pacientes con mutaciones en el exón 12 tienen niveles bajos de EPO.

Finalmente, los pacientes con mutaciones en el exón 12 de *JAK2* presentan un curso clínico similar a los pacientes con la mutación p.V617F, presentando complicaciones trombóticas, hemorrágicas y transformación de la enfermedad a mielofibrosis o leucemia aguda ^{111,126–128,134,135,137–144}.

Características morfológicas de la médula ósea en pacientes con mutaciones en el exón 12 de *JAK2*

A pesar de que existen estudios limitados sobre la morfología de la médula ósea en pacientes con mutaciones en el exón 12 de *JAK2*, sí se han observado algunas características distintas a los pacientes con la mutación p.V617F. Todos los casos estudiados presentan una hiper celularidad moderada en médula ósea con predominio de hiperplasia eritroide que resulta en una ratio de mieloide a eritroide de 1:1 a 1:6. Además, no se observa panmielopoyesis como en la mayoría de las PV, tampoco *clusters* megacariocíticos compuestos de megacariocitos gigantes con estructura nuclear rara, aunque sí se puede observar hiperplasia granulocítica ^{126,127,135}.

1.3.4.1.3. Otras mutaciones en *JAK2*

A parte de la mutación JAK2V617F y de mutaciones que afectan al exón 12 de *JAK2*, se han descrito otras alteraciones coexistiendo con la mutación p.V617F, como por ejemplo la alteración p.C618R en pacientes con PV (aunque su papel no está claro) ¹⁴⁵ o la mutación p.L611V en pacientes con eritrocitosis aislada. Estudios funcionales, de la coexistencia de ambas mutaciones, mostraron que se producía una activación preferente de la vía de señalización AKT y ERK1/2 y no tanto de la vía de STAT5 ¹⁴⁶.

Por otro lado también se han descrito otras alteraciones en *JAK2* que están presentes en línea germinal, como las mutaciones p.R564Q, p.V617I y la más recientemente descrita p.H608N que, aunque se detecten ocasionalmente, también podrían contribuir en la patogenia de algunos casos de trombocitosis hereditarias, ya que también provocan un aumento de la vía de señalización JAK-STAT ^{147–149}.

1.3.4.2. Mutaciones en el gen de la trombopoyetina

En el año 2006 se describió la presencia de alteraciones activadoras en el gen del receptor de la trombopoyetina (*MPL*, *myeloproliferative leukemia protooncogen*), en cuya vía de señalización también interviene JAK2^{150,151}. Las mutaciones de *MPL* se detectan en un 3-4% de las TE^{152,153} y en un 4-8% de las MFP^{150,152,154} pero no se detectan en pacientes con PV. El porcentaje de mutaciones en *MPL* en pacientes con TE, puede llegar a ser del 10-21% si sólo se consideran aquellos pacientes negativos para la mutación p.V617F de JAK2. Este rango de frecuencia depende de las series estudiadas y de la sensibilidad de los métodos empleados para la detección de las mutaciones en cada uno de los estudios^{152,155,156}.

MPL (1p34)

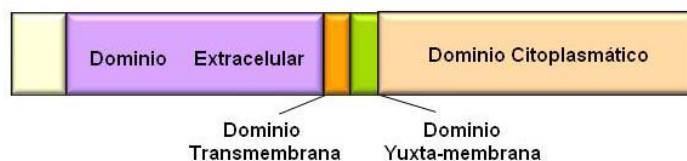


Figura 8: Estructura del gen *MPL*

Las mutaciones principales de *MPL* afectan al aminoácido triptófano en la posición 515 que forma parte del motivo yuxtamembrana anfipático (RWQFP), responsable de mantener el receptor en una configuración inactiva en ausencia de la unión del ligando¹⁵⁷ (Figura 8). Los cambios más frecuentes que afectan a la posición 515 son: p.W515L, p.W515K (ésta última puede resultar de dos sustituciones nucleotídicas distintas) y en menor frecuencia se han detectado casos con las mutaciones p.W515R y p.W515A^{150,152,154,156,158} (Figura 9).

Algunos estudios han demostrado que estas mutaciones afectan a una célula hematopoyética madre común a la estirpe mieloide y linfoide, ya que la mutación se puede detectar tanto en el linaje mieloide como en células linfoides B y T^{118,159,160}.

Otra de las mutaciones descritas en el gen *MPL* es la mutación p.S505N. El residuo S505 está localizado en el dominio transmembrana y, cuando se produce la mutación, el cambio de aminoácido provoca la dimerización del receptor de la trombopoyetina con

independencia de la unión del ligando (TPO) ¹⁶¹. Esta mutación se describió inicialmente como una alteración hereditaria, en un caso de TE familiar ¹⁶², pero estudios posteriores la han detectado en casos de TE o MFP esporádicos, como una alteración somática no presente en línea germinal ¹⁵². De forma similar, previamente a la descripción de mutaciones somáticas en *MPL*, en el año 2004, Moliterno y *col.* también había descrito la presencia del polimorfismo p.K39N en el gen *MPL* que se detectaba específicamente en un 7% de la población Áfrico Americana (Figura 9). Este polimorfismo se asoció a niveles elevados de plaquetas y a una expresión disminuida de MPL resultando en un fenotipo de trombocitosis ¹⁶³.

Estudios *in vitro*, en los que se transfectan las mutaciones p.S505N y p.W515L/K, demuestran que estas alteraciones confieren crecimiento celular independiente a la unión de citocinas y fosforilación de las moléculas dianas de MPL como por ejemplo STAT5, indicando que tienen un papel oncogénico ^{151,154,157,162}. A diferencia de la mutación p.V617F de JAK2 las mutaciones en *MPL* no producen crecimiento endógeno de colonias eritroides aunque sí crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas o granulocíticas-macrofágicas ^{118,159}. *In vivo*, las mutaciones en *MPL* inducen un fenotipo de neoplasia mieloproliferativa similar a la MFP, caracterizada por trombocitosis, marcada esplenomegalia y aumento de fibrosis ¹⁵¹.

Adicionalmente, se han reportado otras alteraciones como la p.V501A o la p.G509C coexistiendo con una alteración en el aminoácido p.W515, pero el significado biológico de estas alteraciones está por determinar ^{155,156} (Figura 9).

Excepcionalmente, se han descrito otras alteraciones potencialmente patogénicas en *MPL*. Ohashi y *col.* reportó el caso de un paciente con TE portador de una alteración compleja en la que se pierden 4 aminoácidos de la secuencia y se insertan dos nuevos (p. W515_P518delinsKT) (Figura 9). Dado que el motivo amfipático de *MPL* está codificado por los aminoácidos 514-518 y esta mutación afecta a gran parte de esta región, es probable que la mutación p. W515_P518delinsKT sea la causante de la TE en este paciente ¹⁶⁴. Más recientemente, Lambert y *col.* describió el caso clínico de una paciente pediátrica con TE portadora de la mutación p.Y252H, localizada en el dominio extracelular de MPL. Dicha alteración provoca una capacidad de proliferación aumentada en médula ósea, un aumento de la vía de señalización activada por la TPO y un moderado aumento de las plaquetas ¹⁶⁵. Estudios *in vitro* demuestran que esta mutación aumenta el crecimiento celular mediado por la TPO aunque el efecto es más débil que el de otras mutaciones más frecuentes de *MPL* (Figura 9).

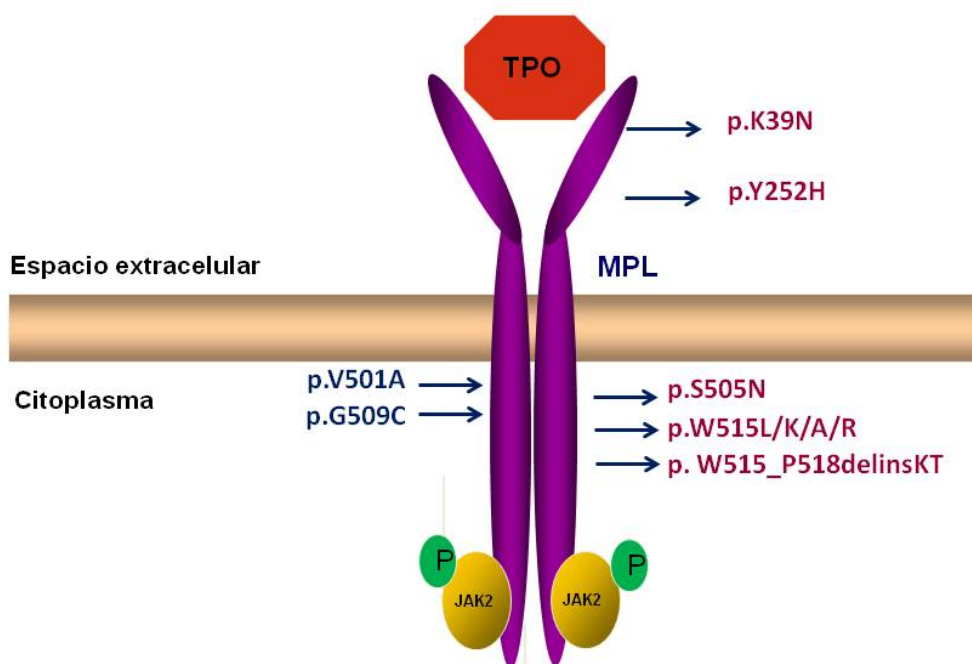


Figura 9: Mutaciones descritas en el gen *MPL*, que codifica para el receptor de la trombopoyetina

Alrededor de un 30% de los pacientes con mutaciones en *MPL* presentan coexistencia con la mutación p.V617F de *JAK2*^{150,153,166}. En MFP, algún estudio sugiere que ambas mutaciones son eventos tempranos en la enfermedad pero que la carga alélica de las mutaciones es importante para determinar el fenotipo de la misma, siendo, en la MFP, la carga alélica de la mutación de *MPL* superior a la de *JAK2*V617F^{153,166}. En el caso de la TE *MPL* positiva, la carga alélica de la mutación de *MPL* es inferior a la que se detecta en casos de MFP, indicando que, tanto el tipo de mutación como la carga alélica de la misma, son importantes para establecer el fenotipo de la NM¹⁶⁶. También se ha reportado la coexistencia de dos mutaciones en *MPL*. En ese sentido, Boyd y col. describió la coexistencia de dos mutaciones en *MPL* en un paciente con TE (p.W515L, p.S505N) y demostraron, mediante genotipado de colonias granulocíticas-macrofágicas (CFU-GM y BFU-E), un patrón de progresión clonal en el que existe una clona fundadora con la mutación p.W515L en heterocigosis, que da lugar a dos clonas distintas: una que adquiere la mutación p.S505N en el otro cromosoma (demostrado mediante clonaje) y

otra clona que muestra la mutación p.W515L en homocigosis ya sea por recombinación mitótica o por adquisición de la misma mutación en el segundo alelo ¹⁵⁵.

Características clínico hematológicas de los pacientes con mutaciones en *MPL*

Los pacientes con MFP que presentan mutaciones en *MPL* tienen un fenotipo clínico caracterizado por tener una mayor tendencia a presentar anemia y a requerir transfusiones en comparación con los pacientes *MPL* negativos ¹⁶⁷. En cuanto a los pacientes con TE *MPL* positivos, éstos también presentan niveles de Hgb significativamente menores y niveles de plaquetas significativamente más elevados que los pacientes *MPL* negativos o *JAK2* positivos ^{152,153,167}.

Características morfológicas de la médula ósea en pacientes con mutaciones en el exón 10 de *MPL*

Se ha observado que los pacientes con TE *MPL* positivos presentan una mayor proliferación megacariocítica aislada en médula ósea en el momento del diagnóstico, con una reducción en la celularidad global en comparación con el grupo *JAK2*V617F positivo y negativo ¹⁵².

1.3.5. Otros marcadores moleculares en neoplasias mieloproliferativas

En los últimos años, se han descrito otros marcadores moleculares en pacientes con PV, TE y MFP. Las alteraciones en estos otros genes se pueden detectar en fase crónica de la enfermedad y algunas de ellas se han asociado, principalmente, a la transformación de la enfermedad a leucemia aguda, aunque también a mielofibrosis. Sin embargo, ninguna de estas mutaciones es específica de estas entidades sino que se pueden detectar, en porcentaje variable, en varias neoplasias mieloides o linfoides e incluso en neoplasias no hematológicas (Tabla 12).

Los nuevos marcadores moleculares identificados en las NM se pueden clasificar en tres categorías:

- 1) Genes implicados en las vías de señalización JAK-STAT: *LNK*, *CBL*, *SOCS*
- 2) Genes implicados en procesos epigenéticos: *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*
- 3) Genes implicados en la maquinaria del *splicing del* ARN mensajero: *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*

1.3.5.1. Nuevos genes implicados en vías de señalización: *LNK*, *CBL*, *SOCS*

Gen *LNK*

El gen *LNK* (*Lymphocyte Adaptor Protein*), también llamado *SH2B3* (*SH2B Adaptor Protein 3*) es un gen localizado en el cromosoma 12q24 que codifica para una proteína que forma parte de la familia SH2B compuesta por otros dos miembros ¹⁶⁸. Esta familia de proteínas adaptadoras se caracteriza por tener una estructura conservada que consta de tres dominios principales (dominio N-terminal rico en prolina, dominio de homología *plekstrin* y dominio SH2) y una tirosina conservada en la región C-terminal.

LNK tiene un papel importante en la hematopoyesis ya que se encarga de regular negativamente la actividad de JAK2 mediante su dominio SH2, inhibiendo así la vía de señalización JAK-STAT tras la activación del receptor de la EPO o del receptor de la TPO, entre otros ^{169,170}. Estudios *in vivo* mostraron que los ratones *knock out* para *LNK* desarrollaban una NM con trombocitosis, esplenomegalia y fibrosis además de una marcada sobreproducción de células ¹⁷¹. Se han descrito mutaciones en *LNK* en un porcentaje bajo de NM, como en MFP (< 5%), en TE (< 5%) ó en eritrocitosis idiopática JAK2V617F negativa (25%). Las mutaciones en *LNK* se han detectado en pacientes con NM que evolucionan a leucemia aguda (13%) y parece que se trata de un evento tardío ya que, en alguno de estos casos, la mutación no se detecta en la fase crónica de la enfermedad ¹⁷² (Tabla 12).

Las mutaciones en *LNK* afectan principalmente al dominio de homología *pleckstrin* (PH), responsable de su localización en la membrana plasmática aunque también se han descrito alteraciones con pérdida de función en otras regiones del gen, como en el

dominio SH2 encargado de la interacción con JAK2 (Figura 10). Algunas de las mutaciones detectadas producen pérdida de función total de la proteína (ej.p.E208X) mientras que otras mutaciones siguen permitiendo cierta actividad inhibitoria de la proteína (ej.p.E208Q).

Gen *c-CBL*

El gen *c-CBL* (*Casitas B-cell lymphoma*) es un gen localizado en el cromosoma 11q23 que codifica para una de las proteínas que forman parte de una familia de tres miembros homólogos que incluyen: *c-CBL*, *CBL-b*, *CBL-c*. Las proteínas *CBL* son proteínas adaptadoras multifuncionales con actividad ubiquitina ligasa. *c-CBL* y *CBL-b* son proteínas que contienen distintos dominios: un dominio N-terminal de unión al dominio tirosina cinasa, seguido de un dominio *Ring* (importante para transferir las ubiquitinas), un *linker* que separa estas dos regiones, una región C-terminal que contiene un dominio rico en prolinas implicado en la unión de varias proteínas SH3 y un dominio C-terminal UBA/LZ implicado en la oligomerización de *CBL* con la unión de la ubiquitina ¹⁷³ (Figura 10). La función principal de estas proteínas es regular negativamente los receptores tirosina cinasa, añadiendo ubiquitinas a los residuos de lisinas de sus proteínas dianas activadas. Esta ubiquitinación provoca la internalización del complejo receptor/ligando y subsiguiente degradación del mismo, inactivando así la vía de señalización previamente activada. También tiene otras dianas como STAT5, a las que también conduce a la degradación. Ensayos *in vivo* en los que se realizan transfecciones retrovirales con la forma de *c-CBL* mutado inducen un fenotipo de mastocitosis y leucemia ¹⁷⁴.

Se han descrito mutaciones en *c-CBL* en varias neoplasias mieloides ¹⁷⁵, especialmente en leucemia juvenil mielomonocítica. En fase crónica, las mutaciones en *c-CBL* son infrecuentes encontrándose en un 6-10% de las MFP y muy raramente en PV o TE ¹⁷⁶ (Tabla 12). Sin embargo, hasta el momento, parece que *c-CBL* está más implicado en la transformación a MF o LAM de una NM que no en la fase crónica de la misma. Las mutaciones en *CBL* afectan principalmente a los exones 8 y 9 de manera que se inactiva la actividad E3 ligasa. Mayoritariamente se trata de mutaciones *missense* en homocigosis, debido a una disomía uniparental adquirida ¹⁷⁷ o, en menor frecuencia, por la pérdida del alelo *wild type*. La pérdida de actividad catalítica pero el mantenimiento de otras funciones da lugar a un aumento de la función y de hipersensibilidad a múltiples citocinas ¹⁷⁸. Las mutaciones en *c-CBL* también pueden coexistir con otras alteraciones como *JAK2*.

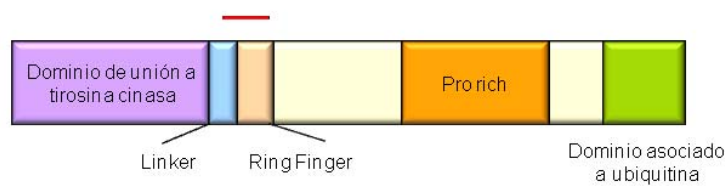
Genes SOCS

Los genes de la familia SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) que incluye SOCS 1, SOCS 2 y SOCS 3 están localizados en los cromosomas 16p13.2,12q22 y 17q25.3, respectivamente, y codifican para las proteínas SOCS1, SOCS2 y SOCS3 que son proteínas que regulan negativamente la vía de señalización de JAK ¹⁷⁹. Se han descrito mutaciones en algunas de las proteínas SOCS en NM aunque con muy baja frecuencia ¹⁸⁰. Sin embargo, sí se ha observado hipermetilación de las islas CpG de los genes SOCS 1 y SOCS 3, disminuyendo así, la expresión de estas proteínas en pacientes con PV y TE JAK2V617F positivos, así como en pacientes con TE JAK2V617F y MPLW515 negativos ^{181,182} (Tabla 12). De forma similar, se ha asociado de forma más específica la metilación del promotor de SOCS 3 con pacientes con MFP JAK2V617F negativos ¹⁸³, aunque el papel de las proteínas SOCS en la patogenia de las NM está por determinar.

LNK (12q24)



c-CBL (11q23)



SOCS 1 y SOCS 3 (16p13, 17q25)



▲ Localización de las mutaciones más frecuentes

Pro: Proline Rich Domain; PH: Plekstrin Homology Domain; SH2: Src Homology 2; KIR: Kinase Inhibitory Region

Figura 10: Estructura de los genes *LNK*, *CBL* y *SOCS* implicados en las vías de señalización y localización de las mutaciones más frecuentes

1.3.5.2. Genes implicados en la regulación epigenética

La regulación epigenética consiste en cambios en el fenotipo o en la expresión genética que se heredan mediante división celular. Estos cambios no se relacionan con los cambios directos en la secuencia del ADN sino que se relacionan con la organización estructural que adopta el ADN dentro del núcleo de la célula. Entre los mecanismos de regulación epigenética se encuentran la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina.

Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un radical metilo (CH₃) a un extremo de la base nitrogenada citosina en algún lugar de la secuencia del ADN. Normalmente, esta metilación ocurre en las islas CpG que son regiones donde existe una alta concentración de citosinas y guaninas que se suelen localizar en la región promotora de los genes controlando la expresión de los mismos. La metilación del ADN se asocia al silenciamiento de la expresión génica.

A continuación se describen los genes, que se han visto alterados en NM, en relación a este proceso.

Gen *TET2*

El gen *TET2* (*Ten Eleven Translocation 2*) está localizado en el cromosoma 4q24 que forma parte de una familia de tres miembros (*TET1*, *TET2* y *TET3*). *TET2* codifica para una proteína hidroxilasa 2-oxoglutarato dependiente de Hierro (II), que es capaz de hidroxilar las citosinas metiladas (5-metilcitosina (5mc)) y generar 5-hidroximetilcitosina (5hmc), probablemente un paso intermedio implicado en la demetilación del ADN^{184–186}. Se han descrito mutaciones en *TET2* en múltiples neoplasias mieloides^{187–190} especialmente en SMD (20-30%) y LMMC (20-45%), y en menor frecuencia en NM (14%)^{189–196} (Tabla 12). Las mutaciones en *TET2* pueden ocurrir en toda la secuencia codificante y pueden ser de varios tipos, pequeñas deleciones, inserciones, sustituciones que incorporen un aminoácido terminador o sustituciones de aminoácidos en posiciones conservadas, que resultan en una pérdida de función catalítica de la proteína (Figura 12). Esta pérdida de función se traduce en un contenido global inferior de 5hmC en aquellos pacientes con alteraciones en *TET2* respecto a los pacientes sin alteraciones en este gen¹⁹⁷.

Inicialmente se describió *TET2* como un gen que podría estar implicado en la patogenia de las NM familiares, ya que se detectó en línea germinal¹⁹⁸. Otros estudios mostraron que también podían observarse alteraciones en NM esporádicas y que, en éstas, la alteración era un evento que precedía a la alteración de *JAK2* en las NM *JAK2* positivas¹⁸⁹. Aun así, estudios posteriores describieron que también podía tratarse de un evento tardío y en ocasiones un evento implicado en la evolución de las NM a LAM^{191,199–201}.

Genes *IDH1* e *IDH2*

Los genes *IDH1* e *IDH2* están localizados en los cromosomas 2q33.3 y 15q26.1, respectivamente, y codifican para las isocitrato deshidrogenasas 1 y 2, que son enzimas NADP^+ que catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG)^{202,203}. Las mutaciones en estos genes, *IDH1* (R132) o *IDH2* (R140, R172) generan unas enzimas neomórficas que catalizan la reducción del α -KG a 2-hidroxiglutarato, que es un metabolito tóxico para la célula (Figura 12). Además, la disminución del α -KG compromete la función de otras proteínas α -KG dependientes como las proteínas TET resultando en una disminución de 5 hmC²⁰⁴ (Figura 11).

Las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* se han detectado en muy baja frecuencia en pacientes con NM en fase crónica: TE (0,8%), PV (1,9%) y MFP (4,2%), en comparación con el 21,6% detectado en fase blástica (Tabla 12). Se precisa de más estudios para determinar si estas mutaciones pueden ser las causantes de iniciar un proceso leucémico o la progresión de una NM a leucemia aguda²⁰⁵.

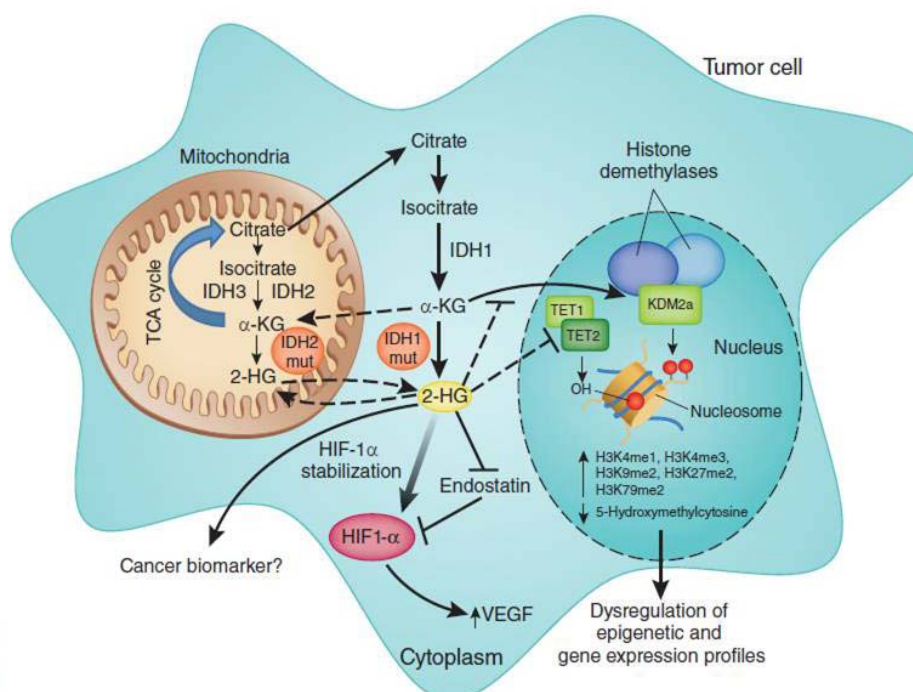
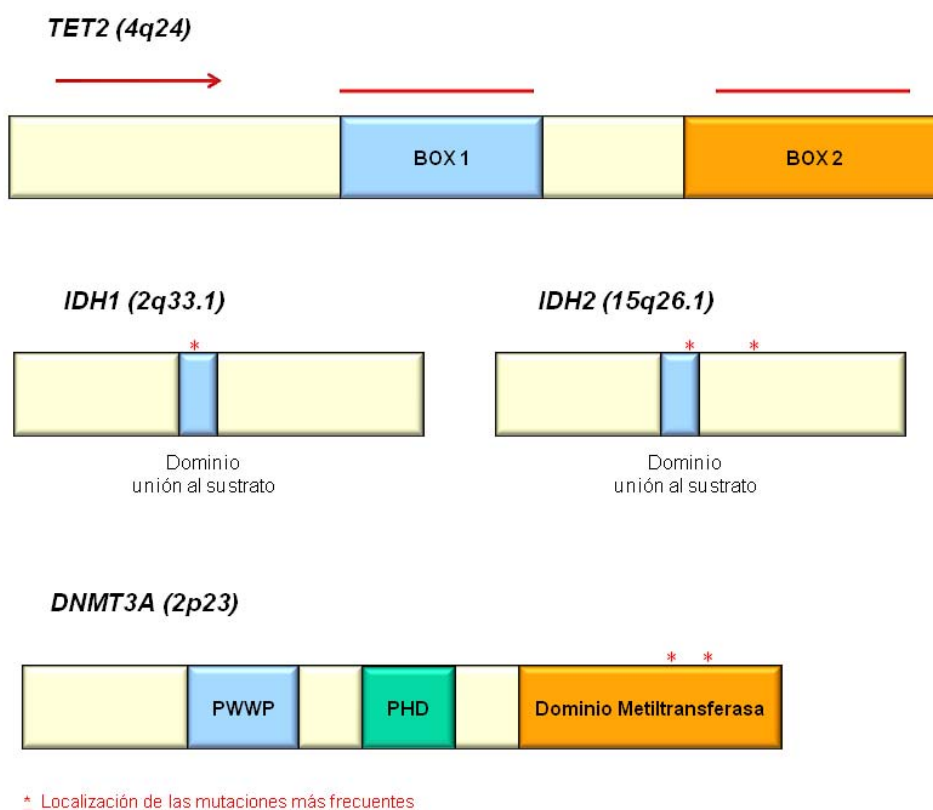


Figura 11: Actividad de las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* y las consecuencias de la generación de 2-HG en las vías de señalización en las neoplasias (Prensner y col., 2011²⁰⁶)

Gen *DNMT3A*

El gen *DNMT3A* (*DNA Methyltransferase 3 A*) está localizado en el cromosoma 2p23 y codifica para una ADN metiltransferasa, una enzima que cataliza la adición de un grupo metilo en el residuo citosina de los dinucleótidos CpG, concentrados en las zonas promotoras de los genes e implicadas en la regulación de la expresión de los mismos. Se han descrito alteraciones a lo largo de toda la secuencia codificante del gen, aunque las mutaciones se concentran, principalmente, en el exón 23 de *DNMT3A* (Figura 12).

Las mutaciones en *DNMT3A* se describieron inicialmente en pacientes con LAM y se asociaron a una peor supervivencia global. Sin embargo, también se detectan en PV, TE y MFP en fase crónica en < 10% de los casos, aunque este porcentaje es superior en pacientes con NM que evolucionan a LAM.



PWWP: Proline Tryptophan Tryptophan Proline; PHD: Plant Homeodomain

Figura 12: Estructura de los genes *TET2*, *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A* implicados en el proceso de metilación del ADN y localización de las mutaciones más frecuentes

Remodelación de la cromatina

El segundo mecanismo de regulación epigenética es la remodelación de la cromatina, que se trata de la modificación dinámica de la estructura de la cromatina con la finalidad de controlar la expresión de los genes. Los dos mecanismos principales son la modificación de las histonas (proteínas implicadas en el empaquetamiento del ADN) y los complejos de remodelación de la cromatina adenosin trifosfato (ATP) dependientes. La modificación de las histonas consiste en distintas modificaciones enzimáticas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación) en las regiones N-terminales de las histonas. Finalmente, los complejos de remodelación de la cromatina ATP dependientes también pueden causar el desplazamiento, la expulsión o la reestructuración de los nucleosomas, repercutiendo, finalmente, en la expresión génica.

A continuación se describen los genes, que se han visto alterados en NM, en relación a este proceso.

Gen ASXL1

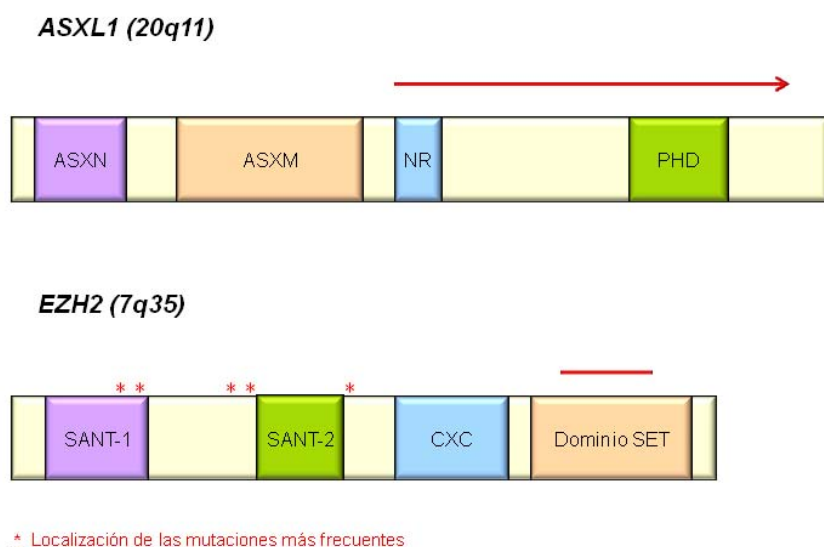
El gen *ASXL1* (*Additional Sex Combs-Like 1*) está localizado en el cromosoma 20q11.21 y forma parte de una familia de tres miembros (*ASXL1*, *ASXL2*, *ASXL3*) que codifica para una proteína probablemente implicada en el control de la estructura de la cromatina. En *Drosophila*, *Asxl1* forma parte de un complejo que deubiquitina la lisina 119 de la histona H2A junto con la proteína BAP1²⁰⁷ y está implicada en la represión de los genes HOX. Aun así, se desconoce si tiene una función similar en mamíferos y cuál es su papel exacto en la hematopoyesis. Las mutaciones en *ASXL1* son generalmente mutaciones *frameshift* o *nonsense* que afectan, principalmente, al exón 12 del gen aunque pueden detectarse a la largo de toda la secuencia codificante. Estas mutaciones hacen que se pierda el dominio PHD en la región carboxiterminal^{208,209} (Figura 13). Las mutaciones en *ASXL1* se han detectado en varias neoplasias mieloides como SMD, LAM y LMMC. En NM en fase crónica la incidencia de mutaciones es menor que en las enfermedades anteriores, siendo infrecuentes en TE y PV (< 7%), aunque se detectan con mayor frecuencia en MFP (19-40%) (Tabla 12).

Gen EZH2

El gen *EZH2* (*Enhancer of Zeste Drosophila Homolog 2*) está localizado en el cromosoma 7q35 y codifica para una de las subunidades catalíticas del complejo *Polycomb r*

Repressive Complex 2 (PRC2). Las proteínas EZH (EZH1, EZH2) son metiltransferasas implicadas en la di o trimetilación de la lisina K27²¹⁰⁻²¹² de la histona H3 (H3K27) y por tanto contribuyen, entre otras funciones, en la regulación de la estructura de la cromatina. Se ha descrito sobreexpresión de EZH2 en varias neoplasias sólidas²¹³ así como mutaciones con ganancia de función que afectan al aminoácido Y641 en linfomas de célula B²¹⁴. Por el contrario, en neoplasias mieloides se han descrito alteraciones a lo largo de toda la secuencia codificante del gen, provocando el truncamiento de la proteína o bien alterando amino ácidos esenciales de manera que se produce la pérdida de función de la enzima (Figura 13).

Las alteraciones en *EZH2* se han detectado en SMD (5,8-23%) y en NM como la PV (3%) o la MFP (13%)²¹⁵ y se han asociado a un peor pronóstico de la enfermedad (Tabla 12).



ASX: Dominios conservados; NR: Nuclear Receptor; PHD: Plant Homeodomains; SANT: SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB (SANT) domains; CXC: cysteine-rich; SET: evolutionarily conserved carboxy-terminal Su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax domain

Figura 13: Estructura de los genes *ASXL1* y *EZH2* implicados en el proceso de remodelación de la cromatina y localización de las mutaciones más frecuentes

1.3.5.3. Genes implicados en la maquinaria del *splicing*

La mayoría de los genes eucariotas están constituidos por exones (regiones codificantes) e intrones (regiones no codificantes) que se transcriben a una molécula de ARN mensajero precursor (pre-ARNm) que incluye todas estas secuencias. En el proceso de maduración o *splicing* del ARN mensajero (ARNm), los intrones se escinden y los exones se unen para dar lugar a un ARNm maduro que se traducirá a proteína. La mayor parte de los genes de forma fisiológica tienen *splicing* alternativo en los que se generan distintas isoformas de ARNm que darán lugar a distintas proteínas con distinta función ^{216,217}. El *splicing* del ARN se cataliza por el *spliceosoma* que es una macromolécula compuesta por cinco pequeños ARN nucleares (snRNAs: *small nuclear RNA*) asociados a proteínas para formar partículas llamadas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs: *small nuclear ribonuclearproteins*). Existen dos clases de intrones, dependiendo de las secuencias consenso que dan lugar a las señales de *splicing*, los intrones tipo U2 que constituyen casi el 99,7% de los intrones humanos y los intrones U12 que son minoritarios ^{218,219}. Para cada tipo de intrón intervendrán distintos *spliceosomas* que difieren en los snRNAs pero que comparten la mayoría de las proteínas implicadas en el *splicing* ^{219,220}.

Existen distintas proteínas que interaccionan con los snRNAs para dar lugar a los snRNPs que forman el *spliceosoma*, como por ejemplo SRSF2, U2AF1, ZRSF2, SF1, SF3B1, SF3BA1 y PRPF40B. Estas proteínas tienen un papel en la regulación de la transcripción ²²¹.

Las alteraciones en el *splicing* del ARN pueden ser el resultado de cambios en las secuencias de las señales de *splicing*, en las secuencias reguladoras del *splicing* y de mutaciones en genes que componen el *spliceosoma*. Alteraciones en los distintos elementos implicados en este proceso pueden producir defectos en las isoformas proteicas (debido a la activación de señales de *splicing* incorrectas, retenciones de intrones o *splicing* alternativos aberrantes) provocando defectos en la regulación de la proliferación o diferenciación ²²².

Entre las proteínas que forman el *spliceosoma* las que se han visto implicadas en las NM son las codificadas por los genes: *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*.

Gen SF3B1

SF3B1 (*Splicing Factor 3B, Subunit 1*) es un gen localizado en el cromosoma 2q33.1 que codifica para la subunidad 1 del complejo proteico 3b del factor de *splicing* (SF3b) que está implicado en las primeras fases del ensamblamiento del *spliceosoma*.

Las mutaciones somáticas en *SF3B1* se detectaron, inicialmente, en alrededor de un 30% de pacientes con SMD y en un 20% de los pacientes con síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo (SMD/NM), siendo el porcentaje mucho mayor en pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo (87%)²²³⁻²²⁵. En neoplasias mieloproliferativas la detección de mutaciones es infrecuente aunque se ha observado que un 6,5% de las MF presentan mutaciones en dicho gen²²⁶ (Tabla 12). Por otro lado, también se han detectado mutaciones en neoplasias linfoides como la leucemia linfática crónica (LLC), en un 10-15% de los casos^{227,228}. Las mutaciones pueden afectar a varios puntos de la secuencia codificante, pero el *cluster* de mutaciones se encuentra, principalmente, entre los exones 12-16 del gen (Figura 14).

Las alteraciones en *SF3B1* parecen mantener la integridad estructural de la proteína pero aun así, alteran su función. Algunos de los estudios de perfiles de expresión génica demostraron que las mutaciones en *SF3B1* estaban asociadas con una *down regulation* de genes implicados en vías de señalización mitocondrial²²⁴ y parecen tener un papel más asociado con elementos fenotípicos, como lo es la presencia de sideroblastos en anillo, que con propiedades transformadoras.

En cuanto al valor pronóstico de las alteraciones en *SF3B1*, algunos estudios demostraron que las mutaciones conferían mejor pronóstico en los pacientes con SMD respecto a los pacientes sin mutaciones en este gen^{225,229}. Otros estudios no demostraron ningún efecto significativo de la mutación en el pronóstico de la enfermedad en este grupo de pacientes²³⁰. Por el contrario, en LLC, se ha descrito que los pacientes con mutaciones en *SF3B1* tienen una enfermedad más agresiva y una menor supervivencia global en comparación con los pacientes sin estas mutaciones²²⁷.

Gen SRSF2

El gen *SRSF2* (*Splicing Factor Serine/Arginine-Rich, 2*) está localizado en el cromosoma 17q25.2 y pertenecen a la familia de factores reguladores del *splicing serine/arginine (SR)-rich*. Esta proteína se une a las secuencias de los elementos reguladores del *splicing* en los transcritos del pre-ARNm y a componentes del *spliceosoma*, y pueden

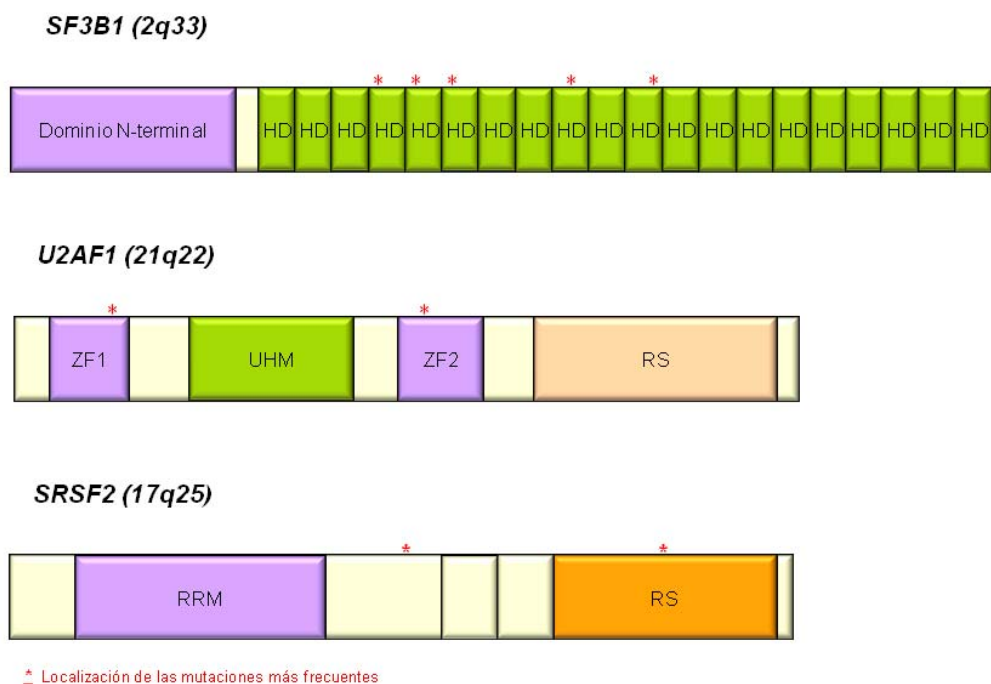
tanto activar como reprimir el *splicing*, dependiendo de la localización del lugar de unión al pre-ARNm.

Las alteraciones en *SRSF2* son las alteraciones más frecuentes en genes del *splicing* y afectan, principalmente, al aminoácido P95 (Figura 14). Las mutaciones en este gen se detectan en LMMC^{231,232}, así como en SMD^{223,229 223,229,231}, MF⁶⁵ y NM evolucionadas a LAM (19%)²³³. Hasta el momento se ha demostrado que las mutaciones en *SRSF2* confieren un pronóstico desfavorable especialmente en MFP, y pueden coexistir con otras mutaciones como *TET2*, *ASXL1* y *RUNX1*, aunque no suelen coexistir con alteraciones en otros genes del *spliceosoma* como *U2AF1*.

Gen *U2AF1*

U2AF1 (*U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor*) es un gen localizado en el cromosoma 21q22 y codifica para una proteína implicada en la maquinaria del *splicing* que pertenece a la familia de factores reguladores del *splicing serine/arginine (SR)-rich*. Esta proteína tiene un papel en el reconocimiento de las señales de *splicing* en la región 3' y media las interacciones directas con otras proteínas del *spliceosoma* como *U2AF2* y otros reguladores del *splicing* como *SRSF1* y *SRSF2*.

Las mutaciones en *U2AF1* se localizan en los exones 2, 6 y 7 (Figura 14), y se detectan en un 10% de los SMD, en LAM secundarias y hasta en un 20% de las LMMC. Las mutaciones en *U2AF1* también parecen conferir mal pronóstico en LMMC²²⁹.



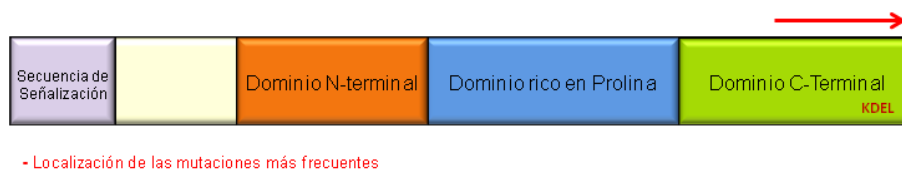
HD: Heat Domain; ZF: Zing Finger; RS: Arginine-serine rich domain; UHM: U2AF Homology Domain; RRM: RNA Recognition Motif

Figura 14: Estructura de los genes *SF3B1*, *SRSF21* y *U2AF1* implicados en el proceso del *splicing* del ARN mensajero y localización de las mutaciones más frecuentes

1.3.5.4. Mutaciones en el gen *CALR*

A finales del año 2013, dos grupos publicaron simultáneamente sendos trabajos en los que se describían mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina (*CALR*), convirtiéndose en el segundo marcador de clonalidad más frecuente en las NM después de la mutación JAK2V617F^{234,235}.

El gen *CALR* está localizado en el cromosoma 19p13.2 y codifica para una chaperona del retículo endoplasmático que está implicada en procesos de regulación del plegamiento de las glicoproteínas y contribuye a la homeostasis del calcio^{236,237}.



KDEL: Señal de retención del retículo endoplasmático

Figura 15: Dominios funcionales de la proteína CALR y localización de las mutaciones más frecuentes

Las mutaciones en *CALR* se detectan, esencialmente, en pacientes con TE (49-84%) y en MFP (67-88%) *JAK2* y *MPL* negativas, representando un 15-20% de las mutaciones detectadas en TE. Aunque en la mayoría de los casos las mutaciones de *CALR* y *JAK2* se consideran mutuamente excluyentes, algunos estudios han reportado la coexistencia de mutaciones en *JAK2* y *CALR* en pacientes con TE y MFP ²³⁸⁻²⁴⁰. Hasta el momento, en ningún trabajo se han detectado mutaciones en *CALR* en pacientes con PV *JAK2* positivos, lo que concuerda con que sean, por lo general, alteraciones mutuamente excluyentes ²⁴¹. Ocasionalmente, también se han detectado algunos casos con mutaciones en *CALR* en pacientes con RARS-T y en algún paciente con SMD (LMMC o LMC atípica). Por el contrario, no se han detectado mutaciones de *CALR* en neoplasias linfoides, tumores sólidos o líneas celulares ^{234,235}. Las mutaciones en *CALR* son principalmente mutaciones heterocigotas (deleciones o inserciones) que afectan al exón 9 del gen y como consecuencia provocan un cambio en la pauta de lectura de la proteína normal. Se han reportado hasta 36 tipos de mutaciones distintas. Las dos mayoritarias son la mutación tipo 1, que consiste en una delección de 52 pares de bases y la mutación tipo 2 que consiste en una inserción de 5 pares de bases ²³⁴.

En la proteína no mutada, el dominio C-terminal de la proteína está cargado negativamente y contiene el motivo de retención de retículo endoplasmático (la secuencia aminoacídica KDEL) y lugares de unión al calcio. La presencia de mutaciones altera la pauta de lectura, eliminando la secuencia KDEL, además de cambiar varios aminoácidos negativos por otros positivos en el dominio C-terminal (Figura 15). Las mutaciones tipo 1 eliminan casi todos los aminoácidos negativos, mientras que la mutación de tipo 2 elimina el 50% de ellos. Está por determinar si el tipo de mutación presente podría tener alguna consecuencia en el fenotipo final de la enfermedad ^{234,235}.

Estudios en progenitores hematopoyéticos han demostrado que estas alteraciones se adquieren en un progenitor multipotente capaz de generar progenie mieloide y eritroide y que se trata de un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad ²³⁵.

Por otro lado, estudios funcionales de la mutación tipo 1 mostraron que esta alteración provoca crecimiento celular independiente a la presencia de citocinas y que también está asociado a la vía de señalización JAK-STAT.

A nivel clínico, en la TE, las mutaciones en *CALR* se han asociado a niveles más bajos de Hgb y leucocitos y niveles más elevados de plaquetas, en el momento del diagnóstico, en comparación a los pacientes con la mutación *JAK2V617F*^{234,235,242,243}. De forma similar, en la MFP las mutaciones en *CALR* se han asociado a niveles más bajos de leucocitos y niveles más elevados de plaquetas que los pacientes *JAK2* positivos.

Los pacientes con TE *CALR* positivos presentan un menor riesgo trombótico respecto a los pacientes con TE *JAK2V617F* positivos ^{234,235,240,242,243}. Por otro lado, en relación a la supervivencia global, se ha descrito que los pacientes que presentan una mutación en *CALR* tienen una mayor supervivencia global respecto a los pacientes con PV, e incluso respecto a los pacientes con TE *JAK2* positivos. Por el contrario, otros trabajos no observan ninguna asociación significativa entre la supervivencia global y la presencia de los distintos marcadores moleculares. Finalmente, mientras que algunos estudios observan una mayor incidencia de transformación mielofibrótica en los pacientes *CALR* positivos, otros estudios no han observado diferencias significativas entre los grupos de pacientes con mutaciones en *JAK2* o *CALR* ^{235,242,243}.

Los estudios muestran que analizando las mutaciones de *JAK2*, *MPL* y *CALR* un 90% de las NM tendrían un marcador de clonalidad, tan sólo restaría un 10% de las TE o MFP sin marcador, en los que otros genes podrían ser los causantes de la enfermedad.

La detección de mutaciones en *CALR* es un potencial marcador diagnóstico de forma similar a la mutación *JAK2V617F* y ya se ha propuesto como un criterio a añadir en la próxima clasificación de la OMS para el diagnóstico de la TE y de la MFP *JAK2V617F* negativa ²⁴.

Características en la médula ósea de pacientes con mutaciones en el exón 9 de *CALR*

El estudio de la biopsia ósea es obligatorio para discriminar entre la TE y la MFP incluyendo la mielofibrosis prefibrótica, así como para el diagnóstico de los pacientes sin mutaciones en *JAK2*, *MPL* y *CALR* (triple negativos).

En el estudio de Vannuchhi y *col.* describen la utilización de un anticuerpo policlonal que hibrida con un péptido C-terminal resultante de la proteína calreticulina mutada. Este anticuerpo resultó muy específico ya que las muestras de pacientes sin enfermedades hematológicas y las muestras de los pacientes con TE o MFP *JAK2* o *MPL* positivos o triples negativos no mostraban tinción positiva. Por el contrario, distintas variantes de la proteína *CALR* mutada mostraban una fuerte tinción. Además, se observó que la tinción se localizaba principalmente en los megacariocitos grandes y de formas maduras como los observados en la TE y en megacariocitos atípicos como los observados en la MFP avanzada. La tinción en otras células mieloides y eritroides era mucho más débil en comparación con la de los megacariocitos. La tinción con un anticuerpo anti-*CALR* no mutada mostró que, de forma fisiológica, existe una expresión preferencial de calreticulina en los megacariocitos. Estos resultados sugieren la idea de que la adquisición de mutaciones en *CALR* en una célula madre hematopoyética inmadura resulta en una expansión preferencial del linaje megacariocítico ²⁴⁴. De forma similar, en el estudio de Álvarez-Larrán y *col.* también se observó que existían mayores agrupaciones densas de megacariocitos en los pacientes con mutaciones en *CALR*, así como una tendencia a la asociación de las mutaciones en *CALR* con el hecho de presentar una elevada frecuencia de megacariocitos con morfología atípica y proliferación vascular ²⁴⁵.

Tabla 12: Principales genes implicados en las NM

Gen	Exón (Mutación)	Localización	Proteína	PV (%)	TE (%)	MF (%)
<i>JAK2</i>	Exón 14 (V617F)	9p24	JAK2	95-97	60	60
<i>JAK2</i>	Exón 12	9p24	JAK2	1-2	-	-
<i>CALR</i>	Exón 9	19p13	CALR	infr	33	25
<i>MPL</i>	Exón 10 (S505;W515)	1p34	TpoR	infr	3-5	5-10
<i>CBL</i>	Exones 8-9	11q23	CBL	infr	infr	5-10
<i>SH2B3</i>	Exón 2 principalmente	12q24	LNK	1	3-6	3-6
<i>TET2</i>	Exoma completo	4q24	TET2	10-20	5	10-20
<i>IDH1</i>	Exón 4 (R132)	2q34	IDH1	infr	infr	6
<i>IDH2</i>	Exón 4 (R140,R170)	15q26	IDH2	infr	infr	6
<i>ASXL1</i>	Exón 12 principalmente	20q11	ASXL1	2-5	2-5	13-20
<i>EZH2</i>	Exoma completo	7q36	EZH2	1-3	1	5-10
<i>DNMT3</i>	Exón 23 principalmente	2p23	DNMT3A	5-10	1-5	5-10
<i>SF3B1</i>	Exones 15-16	2q33	SF3B1	infr	infr	6
<i>SRSF2</i>	Exón 1	17q25	SRSF2	infr	infr	17
<i>U2AF1</i>	Exones 2, 4-6	21q22	U2AF1	infr	infr	16

Infr: infrecuentes

1.4. FACTORES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA AL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LAS NM

1.4.1. Haplotipo 46/1 del gen *JAK2*

La existencia de familias con varios miembros afectados de alguna neoplasia mieloide sugiere la existencia de factores de predisposición genética, presentes en línea germinal, que predisponen al desarrollo de una NM²⁴⁶⁻²⁴⁹. Por otro lado, la existencia de pacientes con más de una alteración en genes implicados en vías de señalización y la demostración de que cada una de las clonas tiene un origen distinto, sugiere la existencia de algún factor constitucional que hace que exista más inestabilidad genética en estos pacientes y que favorezca la adquisición de múltiples alteraciones¹³³. Uno de los marcadores descritos que predisponen al desarrollo de una NM es un haplotipo localizado en el locus del gen *JAK2* conocido como haplotipo 46/1 o GGCC.

El estudio de Jones y *col.* observó que el haplotipo 46/1 se detecta más frecuentemente en NM *JAK2* positivas (48-54%), comparado con controles sanos o casos con eritrocitosis idiopática en los que la frecuencia era similar entre sí (24%). El papel del haplotipo 46/1 en las NM *JAK2* negativas sigue siendo un tema controvertido. Algunas series describen una mayor frecuencia del haplotipo en pacientes con TE o MFP *JAK2* negativos respecto al grupo control, y otros estudios no encuentran diferencias en la frecuencia del haplotipo entre TE *JAK2* positivas y negativas pero sí respecto a la población control. Sin embargo, otras series muestran resultados opuestos, no detectando diferencias significativas entre NM *JAK* negativas y el grupo control, con lo que se precisan más estudios para determinar la relevancia del haplotipo de *JAK2* en el desarrollo de la TE^{250,251}.

Algunos de los estudios en los que asociaban la presencia de la mutación *JAK2V617F* con la presencia del haplotipo 46/1 también observaron que la mutación se adquiría de una forma no aleatoria en el alelo del haplotipo 46/1. Para explicar este hecho se han postulado dos hipótesis. Una de ellas es la hipótesis de la “hipermutabilidad”, en la que se sugiere que el alelo con el haplotipo 46/1 es más inestable genéticamente de forma inherente con lo que es más susceptible de adquirir mutaciones. Por otro lado, existe la teoría del “*fertile ground*” en la que se postula que el haplotipo 46/1 tiene algún factor que confiere ventaja selectiva a la clona *JAK2V617F* positiva propiciando el desarrollo de una NM^{250,252,253}.

1.4.2. Polimorfismo del gen *XPB*

El estudio de Hernández-Boluda y *col.* describió la asociación de un polimorfismo en el gen *ERCC (XPB)*, con un mayor riesgo de transformación a LAM y a desarrollar otras neoplasias no mieloides. El gen *XPB* codifica para una ADN helicasa implicada en procesos de reparación del ADN por escisión (*nucleotide excision repair, NER*), inicio de transcripción y regulación de ciclo celular. Los resultados de este estudio mostraron que los pacientes que presentaban el cambio p.Lys751Gln (rs13181) en homocigosis presentaban un riesgo hasta cinco veces mayor de evolucionar a LAM o a desarrollar otra neoplasia, que los pacientes que no presentaban este cambio. Sin embargo, no se ha asociado la presencia de este polimorfismo con el riesgo de transformación mielofibrótica²⁵⁴.

En este estudio se sugiere que la presencia de variaciones genéticas, intrínsecas a cada paciente y presentes en línea germinal pueden tener un papel significativo en el curso de una NM.

1.4.3. Polimorfismo del gen del receptor de los glucocorticoides

El gen del receptor de los glucocorticoides (*GR*) es un gen polimórfico localizado en el cromosoma 5q31-32, que produce hasta 256 combinaciones de homodímeros y heterodímeros alternativos de *GR*, que se expresan diferencialmente en la población humana. Se ha descrito un polimorfismo en la región UTR (*untranslated region*) del *GR* (A3669G, rs6198) que parece estabilizar el ARNm de la isoforma β que es una variante dominante negativa del receptor.

Un estudio mostró que en los pacientes con PV, los eritroblastos expresan la forma $GR\beta$ que altera la formación del complejo STAT5- $GR\alpha$, lo cual resulta en una expansión de los eritroblastos en la PV y otras formas de eritrocitosis basadas en la inhibición de la formación de este complejo, con la consecuente desregulación de la expresión de genes como *NF-E2*, *WT1* o *GATA2*²⁵⁵.

Este polimorfismo se detecta más frecuentemente en PV (55%) y en MFP (35%) respecto a controles sanos (9%) o pacientes con TE (6%)²⁵⁵. Otro estudio similar, también demostró que el polimorfismo A3669G confiere predisposición al desarrollo de MFP con exceso de mieloproliferación (leucocitosis, esplenomegalia y mayor número de células CD34+ circulantes al diagnóstico) además de cooperar con *JAK2V617F* en el desarrollo de la transformación blástica de la enfermedad²⁵⁶.

En resumen, el polimorfismo A3669G podría tratarse de un posible factor de predisposición, presente en línea germinal, que confiere predisposición al desarrollo de la PV así como de la MFP y con un cierto papel en la transformación de la MFP a LA.

1.5. BIOLOGÍA DE LA EVOLUCIÓN DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Un porcentaje variable de pacientes con TE o PV evolucionan a mielofibrosis. La evolución a mielofibrosis en la TE se observa en un 0,8-9,3 % de los pacientes a los 10 años del diagnóstico^{44,257} y en el caso de la PV, la transformación a mielofibrosis ocurre en un 16% de los casos a los 10 años y de un 34% a los 15 años de evolución de la enfermedad²⁵.

Se desconocen cuáles son los mecanismos biológicos por los que una TE o PV evoluciona a mielofibrosis. Se han publicado varios estudios en los que se proponen algunas hipótesis para explicar qué alteraciones moleculares pueden contribuir a la progresión de la enfermedad y qué mecanismos o moléculas pueden ser las responsables de la generación de fibrosis.

Algunos trabajos han mostrado que la dominancia clonal de los progenitores hematopoyéticos es una característica de la MFP que también se observa en la MF post-PV o la MF post-TE, junto con un aumento de la carga mutacional de JAK2V617F en la mayoría de los casos. El porqué se adquiere dominancia clonal durante la evolución de la PV o la TE en fase crónica se desconoce aunque se postula que, la adquisición de mutaciones adicionales puede tener un papel en el desarrollo de la dominancia clonal y como consecuencia en la transformación a mielofibrosis o a LAM^{103,258,259}.

De forma similar, se han publicado otros estudios en los que también se observa que la adquisición de mutaciones adicionales a *JAK2* podría estar implicada en la transformación mielofibrótica de la TE o la PV²⁶⁰⁻²⁶². En el estudio de *Brecqueville y col.* por ejemplo, observan que todos los pacientes con MF post-PV tienen la mutación JAK2V617F, igual que los pacientes con PV, pero que la proporción de pacientes con mutaciones adicionales se incrementa del 23% al 40%. Además, observan que los pacientes con una o más mutaciones en la enfermedad inicial tienen mayor probabilidad de progresar y que, algunas de las mutaciones o las alteraciones cromosómicas detectadas, sólo están presentes en la progresión de la TE o la PV²⁶².

Por otro lado, a nivel de la biología de la generación de fibrosis en los pacientes con mielofibrosis, también hay distintas publicaciones recientes aportando información sobre distintos mecanismos o moléculas que pueden estar implicadas.

En primer lugar, se ha observado que los megacariocitos tienen un papel muy importante en el desarrollo de fibrosis. Se cree que en situaciones patológicas los megacariocitos liberan TGF- β y otros factores de crecimiento que pueden inducir producción de colágeno y reticulina por las células fibrogénicas²⁶³⁻²⁶⁶. En ese sentido, el estudio de Ponce y *col.* identificó la presencia de niveles más elevados de TGF- β 1 en los megacariocitos de los pacientes con mielofibrosis respecto a los controles²⁶⁷.

En modelos animales, el estudio de Papadantonakis y *col.* mostró que el gen *LOX* también podría estar contribuyendo a la progresión de la fibrosis. En ese estudio se muestra que los megacariocitos de baja ploidía contienen elevados niveles de *LOX*, que los secretan al microambiente de la médula ósea y una vez se activa la enzima, provoca deposición de fibras de colágeno. Esta enzima activada, también oxida el receptor PDGF mejorando la respuesta de proliferación desencadenada tras su activación²⁶⁸.

Más recientemente, se han descrito niveles elevados de una citocina inflamatoria conocida como lipocalin-2 (*LCN2*) en el plasma de pacientes con mielofibrosis post-PV y post-TE. La citoquina *LCN2* genera un aumento de especies de oxígeno reactivas que provocan daño en el ADN y por tanto apoptosis de las células CD34 positivas normales pero no de las células tumorales. Además, también actúa, mediante otros mecanismos, potenciando la expresión de genes como *RUNX2* u otros genes capaces de afectar a la osteoblastogénesis, la angiogénesis y la deposición de proteínas de matriz, propiciando la generación de un microambiente anormal²⁶⁹.

Las NM también pueden progresar a LA siendo la frecuencia de transformación del 5-15% en pacientes con PV, del 2-5% de pacientes con TE^{270,271} y del 8-20% en los pacientes con MFP²⁷². Aunque la probabilidad de transformación a LA se incrementa tras el tratamiento con fármacos genotóxicos²⁷⁰, se estima que un 25% de las NM evolucionadas a LAM o a SMD no han sido expuestas previamente a un tratamiento citotóxico, sugiriendo que existen factores no asociados al tratamiento que son importantes para la transformación de una NM^{273,274}.

A pesar de la relevancia clínica de la transformación leucémica, el conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan a esta transformación se desconoce. En un 50% de los pacientes con NM *JAK2* positivas que se transforman a LAM, los blastos no son

portadores de la mutación ^{275,276}, lo que sugiere la presencia de otras alteraciones que pueden preceder a la adquisición de JAK2V617F y/o promover la transformación leucémica. Existen varios modelos para explicar este fenómeno. Una explicación sería la pérdida de *JAK2* como consecuencia de un proceso de recombinación mitótica, aunque no se hayan reportado casos confirmando esta hipótesis ^{275,276}. El segundo modelo contempla la posibilidad de una fase pre-*JAK2* de la enfermedad, a partir de la cual se originaría una clona patológica que daría lugar a dos clones independientes una *JAK2* positiva, responsable de la NM y otra *JAK2* negativa responsable de la leucemización (Figura 16,A). Un tercer modelo explicaría la coexistencia de dos clones independientes, una JAK2V617F positiva y otra negativa, algo que se ha demostrado en algunos pacientes mediante estudio del PICX con el que se demostró la presencia de dos clones con origen independiente (Figura 16,B).

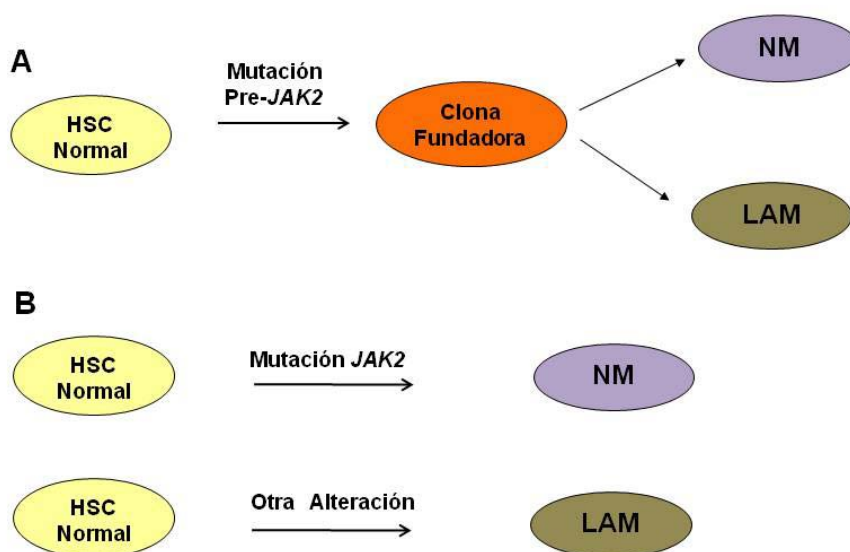


Figura 16: Modelos para explicar la progresión de una NM *JAK2* positiva a una LAM *JAK2* negativa (modificado de Beer y col., 2010²⁷⁷)

En los últimos años se han descrito genes candidatos que pueden ir esclareciendo el conocimiento de aquellas mutaciones que pueden estar contribuyendo a la transformación de una NM a LAM. Los resultados de múltiples estudios muestran que los

espectros de mutaciones son muy heterogéneos y que existen diferencias entre las alteraciones detectadas en una LAM *de novo* y una LAM secundaria a una NM. Los genes más frecuentemente alterados en la progresión de una NM a LAM son *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2* y *TP53*^{201,233,277-279}. Aunque estos genes también pueden estar mutados en LAM *de novo*, las alteraciones moleculares más frecuentes en este tipo de leucemia afectarían a los genes *FLT3*, *NPM1* y *DNMT3A*²⁸⁰. La presencia de varias alteraciones simultáneas en las NM se ha asociado a una peor supervivencia global y una menor supervivencia libre de progresión a leucemia aguda^{238,280}. Algún estudio evidencia que la mayoría de las mutaciones presentes en una LAM secundaria ya están presentes en el momento de la NM aunque sea con una baja carga tumoral. En algunos pacientes se demostró que pueden existir mutaciones en *TP53* en baja carga durante muchos años de la fase crónica de la enfermedad y que, tras la pérdida de heterocigosidad de *TP53*, la clona se expande rápidamente evolucionando a LAM. Otros estudios refuerzan el papel que puede tener las mutaciones en *TP53* en el desarrollo de una LAM secundaria a una NM, aunque no detecten dichas mutaciones en fase crónica

281

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las NM son enfermedades clonales originadas en una célula madre hematopoyética. La clonalidad hematopoyética se puede valorar mediante la detección de alteraciones genéticas recurrentes de variable frecuencia o mediante estudios del patrón de inactivación del cromosoma X (PICX). Se desconoce si la detección de una hematopoyesis clonal en la TE *JAK2V617F* negativa puede tener valor clínico en este grupo de pacientes.

Por otro lado, se ha observado que la MFP suele presentar más mutaciones adicionales a *JAK2V617F* en comparación con la PV o la TE, lo cual concuerda con que exista, en pacientes con MFP, una mayor inestabilidad genética que dé lugar a una enfermedad más agresiva y avanzada. Se desconoce si la presencia de alteraciones adicionales a *JAK2V617F* puede tener un papel en la transformación mielofibrótica de la TE o PV.

Las hipótesis de este trabajo son:

1. La detección de una hematopoyesis clonal en la TE *JAK2* negativa puede tener importancia/significación clínica.
2. La presencia o la adquisición de alteraciones genéticas adicionales a *JAK2* en la PV y la TE, puede ser de relevancia en la transformación mielofibrótica de la enfermedad.

OBJETIVOS

Identificar marcadores moleculares de clonalidad en la TE y PV que pueden estar potencialmente implicados en la transformación a mielofibrosis.

Objetivo 1: Determinar la incidencia y la relevancia diagnóstica de los genes *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* en pacientes con neoplasias mieloproliferativas que carecen de mutaciones en los genes *JAK2* (p.V617F y exón 12) y en *MPL* (exón 10).

Objetivo 2: Evaluar el significado clínico de la detección de clonalidad, analizando el estado mutacional de los genes *MPL*, *TET2*, *ASXL1* o la clonalidad mioide mediante análisis del gen *HUMARA*, en pacientes con TE *JAK2V617F* negativos.

Objetivo 3: Analizar la incidencia de mutaciones en los genes *SF3B1*, *U2AF1* y *SRSF2*, implicados en procesos del *splicing* del ARNm, en pacientes con PV o TE que se transforman a MF. Determinar el posible papel pronóstico de estos marcadores moleculares.

Objetivo 4: Analizar la incidencia de mutaciones en los genes *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, en pacientes con mielofibrosis post-policitémica o mielofibrosis post-trombocitémica. Determinar el posible papel pronóstico de estos marcadores moleculares.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se presentan en formato de dos artículos originales y un trabajo anexo.

Trabajo I. L. Martínez-Avilés, C. Besses, A. Álvarez-Larrán, E. Torres, S. Serrano, B. Bellosillo. TET2, ASXL1, IDH1, IDH2 and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Annals of Hematology*; 91(4):533-41, 2012.

Trabajo II. L. Martínez-Avilés, A. Álvarez-Larrán, C. Besses, G. Navarro, E. Torres, R. Longarón, A. Angona, C. Pedro, L. Florensa, S. Serrano, B. Bellosillo. Clinical significance of clonality assessment in JAK2V617F-negative essential thrombocythemia. *Annals of Hematology*; 91(10):1555-62, 2012.

Anexo: Trabajo III. L. Martínez-Avilés, C. Besses, A. Álvarez-Larrán, L. Camacho, S. Pairet, C. Fernández-Rodríguez, S. Serrano, B. Bellosillo. Mutations in the RNA splicing machinery genes in myelofibrotic transformation of essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*; 164(4):605-7, 2014.

3.1. TRABAJO I

Mutaciones en *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* en neoplasias mieloproliferativas *JAK2* y *MPL* negativas

L. Martínez-Avilés, C. Besses, A. Álvarez-Larrán, E. Torres, S. Serrano, B. Bellosillo.

Se han descrito mutaciones en los genes *TET2* y *ASXL1* en aproximadamente un 14% y 8% , respectivamente, de los pacientes con neoplasias mieloproliferativas (NM) aunque su papel como posibles marcadores moleculares con valor diagnóstico no está determinado. Así mismo, se han reportado alteraciones en otros genes como *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* en distintas neoplasias mieloides principalmente asociados a progresión de la enfermedad. El objetivo del estudio fue determinar la incidencia de mutaciones en estos genes en una cohorte de pacientes con NM (52 TE, 5 PV y 5 MFP) sin mutaciones en los genes *JAK2* (V617F y exón 12) y *MPL* (exón 10). El estudio mutacional incluía el análisis de *TET2* (secuencia codificante), *ASXL1* (exón12), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 y R172) y *c-CBL* (exones 8 y 9) mediante secuenciación Sanger a partir del ARN extraído de granulocitos purificados.

De los 52 pacientes con TE, 3 de ellos presentaban mutaciones patogénicas en el gen *TET2* (4,8%). Tres pacientes (2 TE y 1 MFP) también presentaron mutaciones patogénicas en el gen *ASXL1*. Cabe destacar que un paciente con TE presentaba de forma simultánea una mutación en *TET2* y otra en *ASXL1*. Aunque la incidencia de mutaciones es muy baja no parece haber asociación entre las mutaciones en *TET2* o *ASXL1* y el haplotipo 46/1 de *JAK2*. De forma adicional, para comparar la incidencia de mutaciones en *TET2* y *ASXL1* entre los pacientes con TE *JAK2* positivos y negativos, se analizó una cohorte de 50 pacientes con TE *JAK2*V617F positivos. En ninguno de estos pacientes se detectaron mutaciones en los genes analizados. Finalmente, en relación a los genes *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL*, no se detectaron mutaciones en ninguno de los pacientes analizados. En conclusión, las mutaciones patogénicas en *TET2* o *ASXL1* se detectan en un 8% de las NM negativas para las mutaciones de *JAK2* y *MPL*, mientras que no se detectan alteraciones en los genes *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* en este grupo de pacientes, sugiriendo que no están implicados en el desarrollo inicial de una NM.

TET2, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* genes in *JAK2*- and *MPL*-negative myeloproliferative neoplasms

Luz Martínez-Avilés · Carlos Besses ·
Alberto Álvarez-Larrán · Erica Torres · Sergi Serrano ·
Beatriz Bellosillo

Received: 2 May 2011 / Accepted: 29 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Mutations in the *TET2* and *ASXL1* genes have been described in approximately 14% and 8% of patients, respectively, with classic myeloproliferative neoplasms (MPN), but their role as possible new diagnostic molecular markers is still inconclusive. In addition, other genes such as *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* have also been reported in several myeloid neoplasms. We have studied the mutational status of *TET2* (complete coding region), *ASXL1* (exon12), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 and R172), and *c-CBL* (exons 8 and 9) in 62 MPN patients (52 essential thrombocythemia (ET), five polycythemia vera (PV), and five primary myelofibrosis (PMF)) negative for both *JAK2* (V617F and exon 12) and *MPL* (exon 10) mutations. Pathogenic alterations in the

TET2 gene were detected in three out 52 ET cases (4.8%). *ASXL1* gene pathogenic mutations were also detected in three cases (two ET and one PMF). One ET patient harbored, simultaneously, one *TET2* and one *ASXL1* mutations. Mutations in the *TET2* and *ASXL1* genes showed no association with the *JAK2* 46/1 haplotype. Analysis of a *JAK2*V617F-positive cohort of 50 ET patients showed no mutations in either the *TET2* or *ASXL1* genes. Regarding *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* genes, no mutations were found in any patient. In conclusion, *TET2* and *ASXL1* pathogenic mutations are found in 8% of MPN lacking *JAK2* and *MPL* mutations, whereas *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* mutations are not detected in this subset of patients.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00277-011-1330-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Martínez-Avilés · E. Torres · S. Serrano · B. Bellosillo
Department of Pathology, Hospital del Mar,
Barcelona, Spain

C. Besses (✉) · A. Álvarez-Larrán
Department of Clinical Hematology, Hospital del Mar,
Passeig Marítim 25-29,
08003, Barcelona, Spain
e-mail: cbesses@parcdesalutmar.cat

L. Martínez-Avilés · S. Serrano
Universitat Autònoma de Barcelona, IMIM-Hospital del Mar,
Barcelona, Spain

B. Bellosillo
Universitat Pompeu Fabra, IMIM-Hospital del Mar,
Barcelona, Spain

L. Martínez-Avilés · C. Besses · A. Álvarez-Larrán · B. Bellosillo
Grup de Recerca Aplicada en Neoplasies Hematològiques,
IMIM-Hospital del Mar,
Barcelona, Spain

Keywords *TET2* · *ASXL1* · *IDH1* · *IDH2* · *c-CBL* ·
Mutations

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a spectrum of clonal disorders of the hematopoietic system characterized by overproduction of mature blood elements, a trend to thrombotic and/or hemorrhagic complications and variable rates of transformation to myelofibrosis and acute leukemia. The presence of *JAK2* and *MPL* mutations is a major diagnostic criteria in the WHO classification of classic MPN. However, a variable percentage of patients lack both molecular markers. The molecular basis of *JAK2*- and *MPL*-negative MPN remains largely unexplained. Recently, new molecular markers have been described in a vast array of myeloid cancers. Alterations in the *TET2* gene, a putative tumor suppressor gene located at chromosomal region 4q24, have been identified in 7–13% of MPN patients, in

19–26% myelodysplastic syndromes (MDS), in 12–24% of acute myeloid leukemia (AML), in 20–40% of chronic myelomonocytic leukemia (CMML), and in 29% of systemic mastocytosis [1–8].

More recently, mutations in the *ASXL1* gene which is located in chromosomal region 20q11 have also been reported in several myeloid neoplasms such as MDS (10%), CMML (40%), and MPN (8%). *ASXL1* mutations mainly occur in exon 12, leading to a premature truncated protein that lacks its PHD domain (C-terminal plant homeodomain) involved in the interaction between proteins, and therefore compromising the formation of chromatin modifier complexes. The prognostic relevance of these alterations remains unknown [8–11]. In addition, mutations in the *IDH1* and *IDH2* genes that encode for enzymes responsible of the oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate have been described in around 10% of de novo AML, in 20% AML secondary to a MPN, and more rarely in chronic-phase MPN [8, 12–17]. Finally, alterations in the *c-CBL* gene, that gives rise to the c-Cbl protein with ubiquitin ligase activity and targets a variety of tyrosine kinases for degradation by ubiquitination, have been identified in variable percentages in AML, MDS/MPN, juvenile myelomonocytic leukemia, and CMML patients [18–22].

On the other hand, different studies have identified a *JAK2* haplotype named as 46/1 that seems to predispose to the acquisition of the *JAK2V617F* mutation in the same allele carrying the haplotype, although the underlying mechanism remains unknown. This *JAK2* haplotype has also been associated with the acquisition of *JAK2* exon12 and *MPL* mutations [23–27], but little is known about the correlation between the *JAK2* 46/1haplotype and the aforementioned genes.

The role of *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* mutations in polycythemia vera (PV), essential thrombocy-

themia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) patients who lack *JAK2* and *MPL* mutations has not been widely studied in terms of diagnostic relevance. In addition, their incidence in this subset of patients and the correlation with the presence of *JAK2* 46/1 haplotype is not well known. The aim of this study was to determine the incidence and diagnostic significance of mutations in this group of genes in a cohort of MPN negative for both *JAK2* and *MPL* mutations.

Materials and methods

Patients

From a whole cohort of 241 patients with classic MPN—93 PV, 132 ET, and 16 PMF patients—from our institution and diagnosed according to the WHO criteria, we selected those patients lacking the following genetic alterations: *JAK2V617F*, *JAK2* exon 12 mutations, or *MPL* exon 10 mutations (S505N or W515K/L). A group of 62 patients (five PV, five PMF, and 52 ET) lacking *JAK2* and *MPL* mutations were analyzed for *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* mutations (Table 1). Sixty-one out of 62 patients were analyzed at the chronic phase of the disease. Eight patients were analyzed at the moment of diagnosis whereas the remaining 54 were analyzed during follow-up. The median interval time between the date of diagnosis and the sample collection was 78.2 months (0–367.9). In addition, we analyzed the presence of *TET2* or *ASXL1* mutations in a group of 50 *JAK2V617F*-positive ET patients in order to compare the frequency of mutations in these genes between ET patients positive and negative for the *JAK2V617F* mutation. The study was approved by the local ethics committee, and all patients provided written informed

Table 1 Main characteristics of *JAK2V617F*-negative MPN patients

	ET N=52	PV N=5	PMF N=5
Age ^a	56 (28–86)	51 (32–70)	63 (53–81)
Gender (M/F)	14:38	4:1	1:4
Hb (g/L ^a)	138 (113–166)	194 (183–203)	116 (101–128)
WBC $\times 10^9/L^a$	8 (5–13)	8 (6–10)	9 (6–12)
Platelet count $\times 10^9/L^a$	791 (493–1,471)	347 (167–597)	221 (71–506)
<i>TET2</i> pathogenic mutations	3 ^b /52	0/5	0/5
<i>ASXL1</i> pathogenic mutations	2 ^b /52	0/5	1/5
Status at last follow-up			
Alive in CP	46	5	4
Dead	4	0	1
Transformed	2	0	0
Follow-up (months ^a)	118 (4–296)	215 (95–454)	65 (6–125)

ET essential thrombocythemia, PV polycythemia vera, PMF primary myelofibrosis, M male, F female, WBC white blood cells, CP chronic phase

^aMedian (range)

^bOne patient harbored simultaneously mutations in *TET2* and *ASXL1*

consent according to the Declaration of Helsinki. Biological samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc; Barcelona).

Cell fractionation and RNA extraction

Peripheral blood was collected on ethylenediaminetetraacetic acid. Granulocytes were isolated by Lymphoprep (1.077 g/ml) density gradient, followed by dextran sedimentation. Total RNA was isolated from granulocytes using guanidium thiocyanate method (Ultraspec™ Biotecx Laboratories, Houston, TX). cDNA was reverse transcribed from 1 µg of total RNA with murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) according to standard procedures with random hexamers.

TET2, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* analysis by direct sequencing

The mutational analysis of *TET2* (complete coding region), *ASXL1* (exon 12), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 and R172), and *c-CBL* (exons 8 and 9) was performed by direct sequencing using cDNA from granulocytes. Primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions and primer sequences used for PCR amplification and sequencing are available in the [Electronic supplementary material](#). Sequencing was performed with BigDye v3.1 (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions and analyzed on an ABI3730XL Sequencer (Applied Biosystems). The sequence data files were analyzed using SeqScape software (Applied Biosystems), and all mutations were confirmed with an independent PCR.

Determination of the *JAK2* 46/1 haplotype

Granulocyte DNA samples were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays for the rs12340895 and rs12343867 SNPs (Applied Biosystems). Genotyping was performed in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System.

High-resolution melting analysis for *TET2* mutation detection

High-resolution melting (HRM) analysis was performed using the Light Cycler® High-Resolution Melting Master reagents in a Light Cycler® 480 real-time PCR system (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) using the manufacturer's instructions, with the same primers used in the sequencing analysis.

Cloning assays for the characterization of *TET2* variants

Amplification of the *TET2* cDNA segment comprising exons 3 to 10 (where a fragment of 1,097 base pairs was expected) was performed using the following primers: forward 5'-TGAAATGTCAGGGCCAGTCA-3' and reverse 5'-TGTATAAAGGCAGAACGTGAAGCT-3'.

PCR products obtained were cloned in the pCR4 sequencing vector (Invitrogen) and transformed in TOP10 bacteria (Invitrogen). Individual bacterial colonies were picked and grown overnight in LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin. Plasmids were extracted using the Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) and sequencing of the insert was performed to confirm the different splicing variants.

Results

TET2 mutational status

Three pathogenic mutations in the *TET2* gene were detected in 3 out of 62 MPN patients as shown in Table 2. One alteration consisted in a deletion of 10 nucleotides that led to a frameshift mutation (p.V1395fs) whereas in the other two cases a stop codon amino acid substitution (p.Q706X and p.S1848X) producing a premature truncated protein was observed (Table 2). The three mutations were not present in matched normal DNA from mononuclear cells indicating that these mutations were somatically acquired

Table 2 *TET2* and *ASXL1* mutations in blood cells subpopulations

Patient no.	Diagnosis	<i>TET2</i> mutation		<i>ASXL1</i> mutation		<i>JAK2</i> haplotype 46/1
		Granulocytes	Mononuclear cells	Granulocytes	Mononuclear cells	
1	MF post-ET	p.Q706X	Wild type ^a	Wild type	Wild type	–
2	ET	p.S1848X	Wild type	Wild type	Wild type	+
3	ET	p.V1395fs	Wild type	p.R634fs	p.R634fs	–
4	PMF	Wild type	Wild type	p.N893fs	p.N893fs	+
5	ET	Wild type	Wild type	p.G966_G967del	p.G966_G967del ^a	–

^a Mutational analysis performed in purified T lymphocytes

since they only affected myeloid cells. Of note, two of the mutations (p.V1395fs and p.S1848X) were localized in highly conserved regions of the *TET2* gene.

In 44 out of 62 (71%) patients, a total of 14 different missense mutations and one silent mutation in the coding sequence of the gene were observed. The most frequent missense mutation was the I1762V, which was detected in 28 patients (Table 3). In order to analyze whether these mutations were somatically acquired in myeloid cells, we studied the presence of these variations in DNA obtained from T lymphocytes in 21 cases. All missense and silent mutations were detected in normal DNA suggesting that they were single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *TET2* sequence.

The patient with the *TET2* p.Q706X mutation developed myelofibrosis 12 years after ET diagnosis. The mutation was detected by direct sequencing in a sample obtained at an advanced phase of the disease, but not in a previous sample corresponding to an initial phase of the myelofibrotic transformation (3 years before). In order to confirm that this

mutation was absent at this moment, we performed HRM analysis, which has a higher sensitivity than direct sequencing. With this technique, we detected in the first sample (initial phase of myelofibrosis) a similar melting profile, but with a lower mutant allele burden, to the one observed in the sample obtained three years later, where the *TET2* mutation was detected both by direct sequencing and HRM, suggesting the presence of a small clone with the *TET2* mutation that expanded during the progression of the disease (Fig. 1).

Moreover, analysis of the *TET2* gene showed the presence of two additional cDNA variants to the one corresponding to the whole cDNA, resulting from alternative splicing of mRNA. To confirm the presence of these two variants, amplification of a long cDNA fragment comprising partially exons 3 to 10 was performed. PCR products were cloned in a pCR4 sequencing vector and transformed to competent bacteria. The sequencing analysis of the construct extracted from the positive transformants confirmed the presence of the two additional *TET2* variants. One of them consisted in exclusion of exon 4 causing the direct union between exons 3 and 5, and a second variant consisting in the exclusion of exons 4, 5, and 6, causing the direct union between exons 3 and 7. These results were obtained not only with cDNA from granulocytes and lymphocytes from MPN patients, but also from healthy controls, indicating that the presence of these variants is not associated with the disease since they are also present in healthy controls (Fig. 2).

ASXL1 mutational status

The analysis of the mutational status of *ASXL1* exon 12 in the same cohort of patients, showed the presence of two frameshift mutations leading to premature truncated proteins in one ET and one PMF patient. The two pathogenic mutations were as follows: p.N893fs and p.R634fs. The p.R634fs mutation was found in the same patient in whom the pathogenic p.V1395fs *TET2* mutation was detected. In a third patient, one in-frame deletion of three nucleotides affecting two glycines at amino acid positions 966 and 967 was detected (Table 2). The pathogenic effect of this mutation (p.G966_G967del) resulting only the deletion of one amino acid is currently unknown.

Analysis of normal DNA of the patient who simultaneously carried the *TET2* and the *ASXL1* deleterious mutation showed that the *TET2* mutation (p.V1395fs) was not detected in DNA from peripheral blood mononuclear cells whereas *ASXL1* mutation (p.R634fs) was present in both granulocytes and mononuclear cells. In a similar way, we detected the *ASXL1* p.N893fs and p.G966_G967del mutations in DNA from mononuclear cells in patients 4 and 5, respectively.

In addition, we also detected two missense and four silent mutations in the exon 12 sequence of *ASXL1* in 63% of patients (Table 3). We analyzed the presence of these

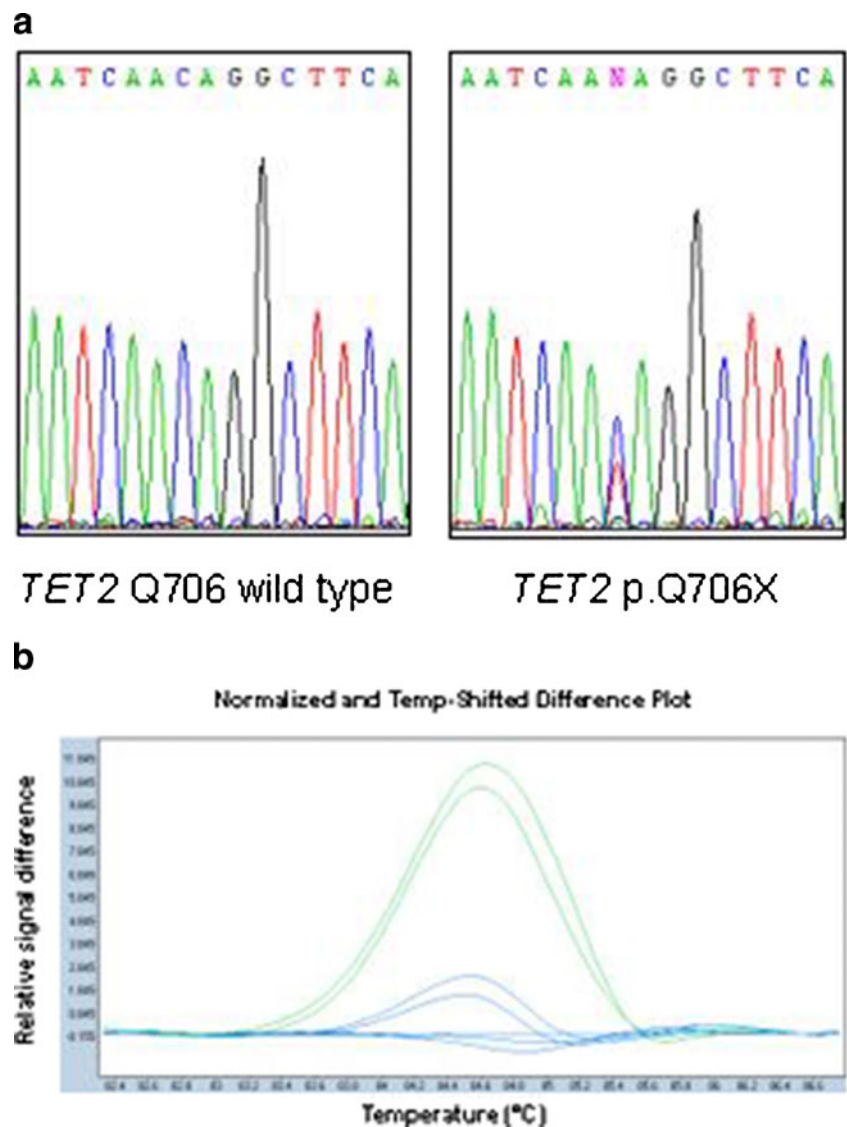
Table 3 Missense and silent mutations detected in the coding sequence of *TET2* and *ASXL1* genes

Variants	Number of patients
<i>TET2</i>	
P29R ^a	2
L34F ^a	4
V218M ^a	3
P363L ^a	5
G355D ^a	3
Y867H ^a	2
Q810R ^a	1
S1039S ^a	1
V1718L ^a	2
M1701I ^a	2
L1721W ^a	12
P1723S ^a	2
I1762V ^a	28
H1778R ^a	5
A1831S	1
<i>ASXL1</i>	
P750P ^a	1
H995H ^a	2
E1102D ^a	1
R1171R	6
S1253S ^a	30
L1325F ^a	1

All these missense and silent mutations have been detected in control DNA suggesting that they probably are SNPs of the coding sequence of *TET2* and *ASXL1*

^a Previously reported *TET2* and *ASXL1* variants

Fig. 1 Mutational analysis of the *TET2* gene segment containing the amino acid Q706. **a** Sequence chromatograms showing the wild-type amino acid Q706 in an early phase of myelofibrosis (*left*) and the *TET2* p.Q706X mutation at an advanced phase of myelofibrosis in a *TET2*-positive MF post-ET patient. **b** HRM profiles of the aforementioned samples showing that the *TET2* mutation was already present in the early phase of myelofibrosis but with a lower mutant allele burden



missense mutations in T lymphocytes DNA being all of them present in non-myeloid cells suggesting that they probably correspond to SNPs of the *ASXL1* coding sequence.

IDH1, *IDH2*, and *c-CBL* mutational status

Regarding the mutational analysis of the *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 and R172), and *c-CBL* (exons 8 and 9) genes, no mutations were detected in any of the 62 patients analyzed, suggesting that these genes might not be involved in the pathogenesis of a myeloid neoplasm in chronic phase.

JAK2 46/1 haplotype

We assessed rs12340895 and rs12343867 SNPs genotypes in order to determine the presence of the *JAK2* 46/1 haplotype in our cohort of MPN without *JAK2* and *MPL* mutations.

Twenty-nine patients did not present the *JAK2* 46/1 haplotype, whereas 33 patients presented this haplotype (29 heterozygous; 4 homozygous). One of the patients with a *TET2* mutation presented a heterozygous *JAK2* 46/1 haplotype, whereas the second one did not present the haplotype. The same results were found in two of the *ASXL1* positive patients. Finally, the patient harboring simultaneously mutations in *TET2* and *ASXL1* did not present the *JAK2* 46/1 haplotype.

TET2 and *ASXL1* mutational status in *JAK2*V617F-positive ET patients

In order to compare the incidence of mutations in *TET2* and *ASXL1* in ET patients according to their *JAK2* mutational status, we analyzed an additional group of 50 *JAK2*V617F-positive ET patients. We did not detect any *TET2* or *ASXL1* pathogenic mutations in this group of patients, suggesting

that the presence of these mutations in JAK2V617F-positive ET patients is less frequent than in JAK2V617F-negative ET patients.

Discussion

In the present study we have analyzed the incidence of *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* and *c-CBL* mutations in 62 MPN patients lacking *JAK2* (V617F or exon 12) and *MPL* (W515K/L and S505N) mutations.

TET2 mutations were observed in three (4.8%) patients, a frequency similar to other studies reporting results on JAK2V617F-negative cohorts (2.5–8%) [1, 2, 5]. Regarding disease specific rates, three out of 52 (5.8%) ET patients harbored *TET2* mutations, a similar incidence found by other authors [1, 5, 8]. To compare the incidence of mutations in ET patients according to their JAK2 mutational status, we analyzed a group of 50 JAK2V617F positive ET patients, but none of them presented mutations in either *TET2* or *ASXL1* indicating that mutations in these genes are less frequent in our series. These results suggest that the study of these genes would mainly be useful in the diagnosis of patients lacking *JAK2* or *MPL* mutations although this finding should be corroborated in more studies.

Mutations in *TET2* were initially described as a genetic event previous to the JAK2V617F acquisition [2] but more recently, some studies have described *TET2* mutations as a late event in the progression of MPN to leukemic transformation [28–31]. In our study, one ET patient carrying a *TET2* mutation developed myelofibrotic transformation. The mutation was detected by direct sequencing in the advanced phase of the myelofibrosis, but analysis by more sensitive techniques such as HRM showed a melting profile corresponding to the *TET2* mutation in the sample from the initial phase of the myelofibrotic transformation, suggesting the presence of a small *TET2*-positive clone that expanded during the progression of the disease. Similarly, Delhommeau et al. [2] reported a patient diagnosed with a *TET2*-negative first phase refractory anemia with excess of blasts (RAEB1) showing a *TET2* mutation when the disease evolved to phase two refractory anemia (RAEB2). These findings support the possibility that *TET2* mutations may not only contribute to the development of a MPN but also represent a late event in the progression of a MPN to leukemic transformation or myelofibrotic transformation [28–31].

Concerning the *TET2* mutational analysis, we detected three different *TET2* isoforms. One of them contained all eleven exons with the expected fusion between exons 3 and 4 whereas the second variant lacked exon 4 and the third one lacked exons 4, 5, and 6. Of note, *TET2* exon 4 partially encodes for one of the highly conserved domains

Fig. 2 Sequencing chromatograms and schematic representation of the *TET2* variants. **a** Sequencing chromatogram showing the expected union between exons 3 and 4 corresponding to the whole coding sequence (GenBank accession number NM_1127208.2; Ensembl accession number ENST00000380013). **b** Sequencing chromatogram showing the direct union between exons 3 and 5 due to exon 4 skipping (not reported in GenBank; Ensembl accession number ENST00000545826). **c** Sequencing chromatogram showing the direct union between exons 3 and 7 due to exons 4, 5, and 6 skipping. **d** Schematic representation of the *TET2* variants found: 1, Transcript variant including all 11 exons (GenBank accession number NM_1127208.2; Ensembl accession number ENST00000380013); 2, transcript variant with exclusion of exon 4 (Ensembl accession number ENST00000545826); 3, transcript variant with exclusion of exons 4, 5, and 6

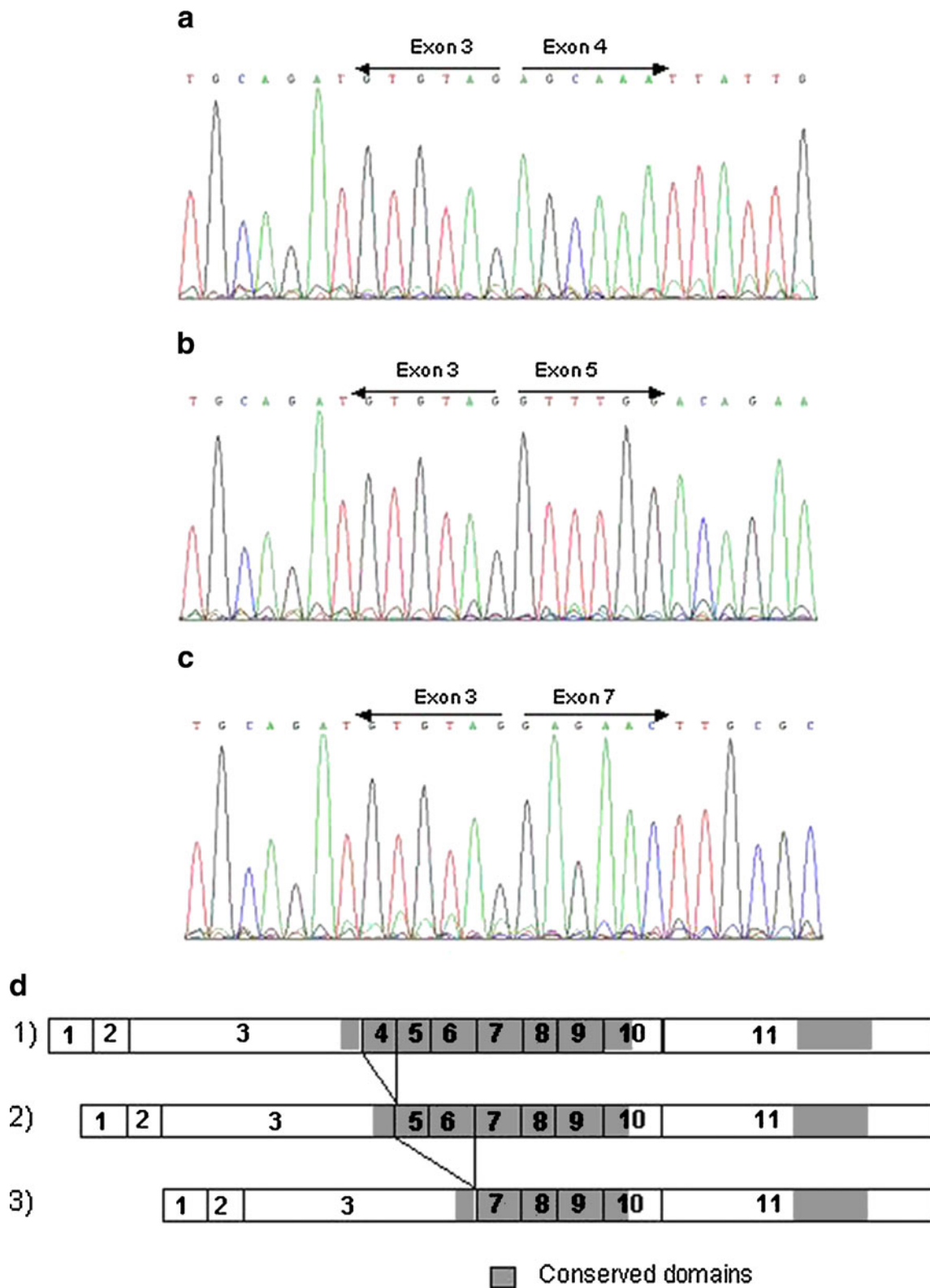
of the *TET2* gene so these additional variants would not contain this conserved domain and the function of these potentially new *TET2* proteins should be further studied. We showed that these variants are also present in healthy controls, so they are less likely to be pathogenic variants.

Mutations affecting exon 12 of the *ASXL1* gene have also been described in different myeloid neoplasms as well as in 11% of MDS, 43% of CMML, and 8% of MPN. In our study, three patients harbored *ASXL1* mutations (4.8%), a lower frequency than the one reported by other studies [10]. Of note, one ET patient harbored simultaneously a *TET2* and an *ASXL1* mutation. Four different silent mutations and two missense mutations were detected in 63% of patients; all of them present in control DNA.

When we analyzed the pathogenic *TET2* and *ASXL1* mutations in those patients whose control DNA was available, we observed that *TET2* mutations were not present in mononuclear cells DNA, indicating that *TET2* mutations mainly affect the myeloid lineage. By contrast, all *ASXL1* mutations were detected in DNA from mononuclear cells suggesting that *ASXL1* mutations may affect an early hematopoietic progenitor or might be present in germline DNA.

We also looked for mutations in the *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* genes that have also been described in myeloid neoplasms, mainly in the novo or secondary acute myeloid leukemia. Similarly to other studies, no mutations were detected in any of the patients with MPN, indicating that these genes are rarely mutated in the chronic phase of a MPN although they might be more relevant in an advanced phase of the disease [12–17].

In ET, around 60% of patients present the JAK2V617F mutation and approximately 8% of JAK2V617-negative ET patients show *MPL* mutations, but there still remains a significant percentage of ET patients without a molecular marker. According to our results, analysis of the *TET2* and the *ASXL1* genes would increase in an additional 8% the percentage of ET patients with a molecular marker of clonality. The incorporation of these determinations in the diagnostic routine is labor intensive if classic Sanger



sequencing is to be used, but the implementation of new technologies such as next generation sequencing, can be helpful to incorporate the mutational analysis of these genes

in the molecular diagnosis of MPN. These new high-throughput technologies can analyze a large number of genes at the same time with a sensitivity of down to 1%,

allowing the detection of mutations in small clones. Recently, several studies have shown that next generation sequencing is a useful tool to detect mutations in myeloid malignancies. The extensive information obtained by these techniques can be used to characterize the molecular pattern of each patient and to better understand the pathogenesis of the disease and its evolution [32, 33]. In this regard, Jädersten et al. showed that the detection of *TP53* mutations in 18% of low-risk MDS were associated with a higher risk of leukemic transformation. In some patients, these mutations were already detectable at an early phase of the disease, with a low mutant allele burden, showing that early detection of mutations could be of prognostic value [34]. Accordingly, next generation sequencing can provide a large amount of molecular information that can be used for a more accurate diagnosis, and potentially as prognostic factors.

Finally, the present study is, to the best of our knowledge, the first one that has assessed the correlation between the *JAK2* 46/1 haplotype and mutations in *TET2* and *ASXL1* genes. In this regard, we could not establish any association between the presence of mutations in these genes and the *JAK2* 46/1 haplotype.

In summary, *TET2* and *ASXL1* pathogenic mutations are found in a low percentage (8%) of MPN lacking *JAK2* and *MPL* mutations, whereas *IDH1*, *IDH2*, and *c-CBL* mutations are not detected in this subset of patients.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Spanish Health Ministry “Fondo de Investigación Sanitaria” EC 07/90791, PI10/01807, Instituto de Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036), and the “Xarxa de Bancs de Tumors sponsored by Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC)”. Luz Martínez-Avilés is recipient of a fellowship from the “Comissionat per a Universitats i Recerca del departament d’ Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.”

References

- Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wang L et al (2009) Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114:144–147
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S et al (2009) Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360:2289–2301
- Couronné L, Lippert E, Andrieux J, Kosmider O, Radford-Weiss I, Penhler D et al (2009) Analyses of *TET2* mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. *Leukemia* 24:201–203
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M et al (2009) Acquired mutations in *TET2* are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 41:838–842
- Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J et al (2009) *TET2* mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23:905–911
- Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J et al (2009) Frequent *TET2* mutations in systemic mastocytosis: clinical, *KITD816V* and *FIP1L1-PDGFRα* correlates. *Leukemia* 23:900–904
- Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM et al (2009) Detection of mutant *TET2* in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 23:1343–1345
- Abdel-Wahab (2011) Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 18:117–123
- Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J et al (2009) Mutations of *ASXL1* gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 23:2183–2186
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N et al (2009) Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematology* 145:788–800
- Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Lasho T, Heguy A, Levine RL et al (2010) Concomitant analysis of *EZH2* and *ASXL1* Mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116:1267, Abstr. 3070
- Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay KO et al (2010) Distinct clinical and biological characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) mutation. *Blood* 115:2749–2754
- Mardis ET, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K et al (2009) Recurring mutations found by sequencing and acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361:1058–1066
- Green A, Beer P (2010) Somatic mutations of *IDH1* and *IDH2* in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 362:369–370
- Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A (2010) *IDH1* and *IDH2* mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24:1146–1151
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D et al (2010) *IDH1* and *IDH2* mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 24:1302–1309
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA et al (2010) The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17:225–234
- Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MH, Grundler R, Rensinghoff M et al (2007) *FLT3*-dependent transformation by inactivating *c-Cbl* mutations in AML. *Blood* 110:1004–1012
- Dunbar AJ, Gondek LP, O’Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H et al (2008) 250 K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of *c-Cbl*, in myeloid malignancies. *Cancer Res* 68:10349–10357
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C et al (2009) Frequent *CBL* mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 113:6182–6192
- Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegauf M, Archambeault S et al (2009) Mutations in *CBL* occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 114:1859–1863
- Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthous T, Argiropoulos B et al (2009) *CBL* exon 8/9 mutants activate the *FLT3* pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 215:2238–2247
- Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL et al (2009) *JAK2* haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41:446–449

24. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL et al (2009) A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41:455–459
25. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I et al (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41:450–454
26. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D et al (2009) The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* 23:1924–1926
27. Jones AV, Campbell PJ, Beer PA, Schnittger S, Vannucchi AM, Zoi K et al (2010) The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115:4517–4523
28. Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D et al (2009) Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 115:2891–2900
29. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J (2010) Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasm to leukemias. *Canc Res* 70:447–452
30. Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, Skoda RC (2010) Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115:2003–2007
31. Kosmider O, Delabesse, Mansat-De Mas V, Cornillet-Lefebvre P, Blanchet O, Delmer A et al (2011) *TET2* mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica* 96:1059–1063
32. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B et al (2010) Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in *TET2*, *CBL*, *RAS*, and *RUNX1*. *J Clin Oncol* 28:3858–3865
33. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, Przychodzen B et al (2010) Next-generation sequencing of the *TET2* gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 116:3923–3932
34. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G et al (2011) TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol* 29:1971–1979

3.2. TRABAJO II

Significado clínico de la determinación de clonalidad en pacientes con trombocitemia esencial JAK2V617F negativa

L. Martínez-Avilés, A. Álvarez-Larrán, C. Besses, G. Navarro, E. Torres, R. Longarón, A. Angona, C. Pedro, L. Florensa, S. Serrano, B. Bellosillo.

La trombocitemia esencial (TE) JAK2V617F negativa es una enfermedad heterogénea que incluye casos clonales y casos sin evidencia de clonalidad. Sin embargo, se desconoce si la detección de clonalidad mieloide en los pacientes con TE sin la mutación JAK2V617F tienen un curso clínico diferente a aquellos en los que no se detecta clonalidad. El objetivo del presente estudio fue evaluar la importancia clínica de la determinación de clonalidad en pacientes con TE JAK2V617F negativos. El análisis de clonalidad mieloide se basó en la evaluación del estado mutacional de los genes *MPL*, *TET2* y *ASXL1* y en el estudio del patrón de inactivación del cromosoma X mediante el análisis del gen de receptor de andrógenos humanos (*HUMARA*). De un total de 186 pacientes diagnosticados de TE en una única institución, se analizaron 73 pacientes en los que no se detectó la mutación JAK2V617F. Se detectaron mutaciones en *MPL* (7 casos), *TET2* (4 casos) y *ASXL1* (2 casos), mientras que la clonalidad mediante el análisis del gen *HUMARA* se demostró en 21 de 46 (46%) mujeres con TE. Con una media de seguimiento de 8 años, se registraron 7 muertes, 10 casos de trombosis, 8 casos de sangrado y 6 casos de transformación de la enfermedad a mielofibrosis o mielodisplasia. No se observaron diferencias en trombosis, sangrado y supervivencia de acuerdo a la detección o no de clonalidad hematopoyética, mediante el análisis del gen *HUMARA* o la detección de mutaciones en los genes analizados. La probabilidad de transformación de la enfermedad a los 10 años era mayor en pacientes que mostraban una hematopoyesis clonal, ya fuera presentando mutaciones en *MPL*, *TET2* o *ASXL* (64% versus 2% sin mutaciones, $p < 0,001$) o presentando clonalidad mediante el análisis del gen *HUMARA* (35% versus 0% en pacientes con hematopoyesis policlonal, $p < 0,004$).

En conclusión, en este estudio, la transformación de la TE en pacientes JAK2V617F negativos se asoció a la evidencia de clonalidad hematopoyética.

Clinical significance of clonality assessment in JAK2V617F-negative essential thrombocythemia

Luz Martínez-Avilés · Alberto Álvarez-Larrán · Carles Besses · Gemma Navarro · Erica Torres · Raquel Longarón · Anna Angona · Carme Pedro · Lourdes Florensa · Sergi Serrano · Beatriz Bellosillo

Received: 3 April 2012 / Accepted: 22 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract JAK2V617F-negative essential thrombocythemia (ET) is a heterogeneous disease including clonal cases and others without evidence of clonality. However, it is unknown if the detection of myeloid clonality in JAK2V617F-negative ET patients confers a different clinical outcome than those in whom clonal hematopoiesis cannot be demonstrated. The objective of the present study was to evaluate the clinical significance of clonality assessment in patients with JAK2V617F-negative ET. Clonality investigation including mutational status of *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* genes and human androgen receptor (*HUMARA*) assay was performed in 73 JAK2V617F-negative cases out of 186 subjects consecutively diagnosed with ET in a single institution, at diagnosis or during follow-up. Mutations in *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* were observed in 7, 4, and 2 cases, respectively, whereas clonality by *HUMARA* assay was demonstrated in 21 out of 46 (46 %) female patients. With a median follow-up of 8 years, death,

thrombosis, bleeding, and disease transformation were registered in 7, 10, 8, and 6 patients, respectively. No differences in thrombosis, bleeding or survival were observed according to clonality assessment. The probability of disease transformation at 10 years was higher in patients showing clonal hematopoiesis by presenting mutations in either *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* (64 versus 2 % in patients without mutations, $p < 0.001$) and in those with *HUMARA* clonality (35 versus 0 % in patients with polyclonal hematopoiesis, $p < 0.004$). In conclusion, disease transformation is associated with evidence of clonality in JAK2V617F-negative ET.

Keywords Clonality · Essential thrombocythemia · Disease transformation

Introduction

Essential thrombocythemia (ET) is a chronic myeloproliferative neoplasm characterized by sustained thrombocytosis, megakaryocytic proliferation, and an increased tendency to thrombosis and bleeding. The detection of the JAK2V617F mutation constitutes a key point in the diagnosis work-up of ET, being positive in 40–60 % of the patients [1–5]. When the JAK2V617F mutation is negative and according to WHO criteria, ET diagnosis requires the demonstration of other clonal marker or, if absent, the exclusion of reactive causes of thrombocytosis [6]. It has been reported that up to 22 % of the women diagnosed with ET are negative for the JAK2V617F mutation but display clonal hematopoiesis by assessment of X-chromosome inactivation patterns (XCIP) analyzing polymorphisms of the human androgen receptor (*HUMARA*) gene [7]. These data suggest that ET is a heterogeneous disease in which other molecular mechanisms different from JAK2 alterations are involved in its pathogenesis. In

Luz Martínez-Avilés and Alberto Álvarez-Larrán equally contributed to this study.

L. Martínez-Avilés · G. Navarro · E. Torres · R. Longarón · L. Florensa · S. Serrano · B. Bellosillo
Department of Pathology, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain

A. Álvarez-Larrán · C. Besses (✉) · A. Angona · C. Pedro
Department of Clinical Hematology, Hospital del Mar-IMIM, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain
e-mail: cbesses@parcdesalutmar.cat

L. Martínez-Avilés · A. Álvarez-Larrán · S. Serrano
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

B. Bellosillo
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

this regard, mutations in other genes like *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* have been reported in a variable proportion of patients with JAK2V617F-negative ET [8–16]. However, the determination of the mutational status of these genes in the routine diagnosis of JAK2V617F-negative ET is not well established since these studies are costly and time-consuming, and it is unknown if patients with such mutations have a different clinical outcome than those in whom clonal hematopoiesis cannot be demonstrated. The objective of the present study was to evaluate the clinical significance of clonality assessment in patients diagnosed with JAK2V617F-negative ET.

Patients and methods

Patients

Between 1981 and 2011, 186 subjects were consecutively diagnosed with ET at the Hematology Department of Hospital del Mar of Barcelona. From the whole cohort of patients with ET diagnosed according to the WHO criteria [6], we selected those patients lacking the JAK2V617F mutation. Chronic myeloid leukemia was discarded in all cases by fluorescent in situ hybridization analysis of translocation t(9;22) (q34.1;q11.2) or by PCR analysis of the *BCR-ABL* fusion gene. Bone marrow biopsy was performed at diagnosis in all patients, and the silver stain was scored on a 0–3 scale being discarded both myelofibrosis and its prefibrotic form.

A group of 73 JAK2V617F-negative patients was analyzed for mutations in *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* genes and for the presence of *HUMARA* clonality. With regard to molecular studies, 32 out of 73 (44 %) patients were analyzed at the moment of diagnosis, whereas the remaining 41 were analyzed during follow-up. The median interval time elapsed between the date of diagnosis and the sample collection was 3.7 years (0–18). The study was approved by the local Ethics Committee, and all patients provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki. Biological samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc) (Barcelona).

Cell fractionation and RNA extraction

Peripheral blood was collected on ethylenediaminetetraacetic acid. Granulocytes were isolated by Lymphoprep (1.077 g/ml) density gradient, followed by dextran sedimentation. Total RNA was isolated from granulocytes using guanidium thiocyanate method (Ultraspec™ Biotecx Laboratories, Houston, TX). cDNA was reverse-transcribed from 1 µg of total RNA with Murine Moloney Leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) according to standard procedures with random hexamers.

HUMARA-PCR assay

The clonality assay based on X-chromosome inactivation patterns (XCIP) of the *HUMARA* gene was performed as follows: mononuclear cells and granulocytes were isolated from peripheral blood. CD3+ lymphocytes were separated from the mononuclear phase using magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Genomic DNA was extracted from each fraction. DNA from granulocytes and lymphocytes were digested with methylation-sensitive restriction enzyme HpaII (Invitrogen, Paisley, UK). PCR analysis of the *HUMARA* exon 1 was performed on digested and nondigested samples according to normal procedures in our laboratory. Clonality was calculated after correcting for the degree of lyonization in isolated CD3+ cells and were considered to be clonally derived when the corrected allele ratio was <0.25 [17].

MPL, *TET2*, and *ASXL1* analysis by direct sequencing

The mutational analysis of *MPL* (exon 10), *TET2* (complete coding region), and *ASXL1* (exon 12) was performed by conventional Sanger sequencing using cDNA from granulocytes as previously described [18]. All mutations were confirmed with an independent PCR.

Analysis of *TET2* and *ASXL1* by next-generation sequencing

Next-generation sequencing (NGS) was applied in two patients to increase the sensitivity of mutation detection at the time of diagnosis. NGS was performed using a 454 GS Junior platform (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Three different amplicons were generated for the detection of two *TET2* and one *ASXL1* mutation, with the use of primers containing the corresponding sequencing adaptors.

PCR products were purified using AmpureBeads (Beckman Coulter Danvers, MA, USA) and quantified using the QuantiT PicoGreen kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Subsequent 454 emulsion PCR and amplicon sequencing was performed according to the manufacturer's recommendations using a Titanium PicoTiterPlate. Processed and quality-filtered reads were analyzed using the GS Amplicon Variant Analyzer software version 2.5p1.

Treatment

Given the retrospective nature of the study, treatment for ET varied over the years. As a general rule, cytoreductive treatment was initiated in patients with a history of thrombosis or with age >60 years. When risk factors for thrombosis were absent, patients were managed with antiplatelet

therapy (usually acetylsalicylic acid (ASA), 100 mg daily) or careful observation. Cytoreductive treatment was instituted in 47 cases including hydroxyurea ($n=42$), radioactive phosphorus ($n=2$), anagrelide ($n=17$), busulphan ($n=2$), and interferon alpha ($n=1$). Some patients received different cytoreductive modalities during the course of the disease, and seven patients received acenocumarol.

Statistical methods

All patients were followed at Hospital del Mar, with diagnosis and follow-up data being obtained from the medical records. The chi-square test was used to compare categorical variables between groups, and the Mann–Whitney U test or the t test was used to compare continuous variables. The following initial variables were analyzed at univariate level for their possible association with survival or the development of thrombosis, bleeding, or disease transformation: age, gender, platelet count, Hb level, WBC count, serum LDH, spleen size, *HUMARA* clonality, and presence of gene mutations. For such purpose, the Kaplan–Meier method was employed followed by the log-rank test. Only nine patients were lost to follow-up, and they were censored at the time of last follow-up. Significance was considered for p values <0.05 . The statistical analysis was performed using the SPSS 11.0 package (SPSS, Chicago, IL).

Results

Characteristics of the patients and clonality assessment

The main clinical and hematological data at diagnosis are shown in Table 1. Cytogenetic analysis was performed at diagnosis in 62 cases showing a normal karyotype or absence of metaphases in 46 and 16 cases, respectively. One case of clonal evolution was documented, namely a del13q at the time of myelofibrotic transformation.

The mutational analysis of *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* was performed in 71 out of 73 JAK2-negative ET patients. The most frequently mutated gene was *MPL*, followed by *TET2* and *ASXL1*. Twelve out of 71 assessable patients harbored mutations in one of the genes studied. *MPL* exon 10 mutations were detected in seven patients (four p.W515L, one p.S505N, one p.W515K, and one p.W515_P518delinsKT), three patients presented *TET2* mutations (p.S1848X, p.Q706X, p.P463fs), and one patient presented an *ASXL1* mutation (p.G966_G967del), as unique alteration. In addition, one patient harbored simultaneously mutations in *TET2* (p.V1395fs) and *ASXL1* (p.R634fs). Patients with mutations were significantly older than those without mutations ($p=0.02$) and received more frequently cytoreductive therapy, although the difference was not statistically significant (75

Table 1 Main clinical and hematological characteristics at diagnosis in 73 patients with JAK2V617F-negative essential thrombocythemia

Age, years ^a	62 (9–93)
Male/female	19/54
Cardiovascular risk factors, no. (%) ^b	42 (57)
ET-related symptoms, no. (%) ^c	19 (26)
History of thrombosis, no. (%)	6 (8)
Palpable splenomegaly, no. (%)	4 (5)
Hemoglobin, g/L ^a	134 (108–166)
WBC count, $\times 10^9/L$ ^a	8.3 (4.8–13)
$>10 \times 10^9/L$, no. (%)	13 (18)
Platelet count, $\times 10^9/L$ ^a	759 (493–1,580)
$>1,000 \times 10^9/L$, no. (%)	17 (23)

^a Median (range)

^b Presence of either smoking, diabetes, arterial hypertension, or hypercholesterolemia

^c Presence of either microvascular disturbances including erythromelalgia, headaches, paresthesia, and visual abnormalities

versus 47 %, $p=0.08$). There were no significant differences according to the presence of mutations with regard to gender, cardiovascular risk factors, or initial hematological values.

Myeloid clonality by *HUMARA* assay was assessed in 51 out of 54 female patients. In 46 cases, an informative result was obtained, with clonal hematopoiesis being demonstrated in 21 patients (46 %). The main clinical and hematological data according to clonality assessed by *HUMARA* are shown in Table 2. In 43 patients, both *HUMARA* assays and *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* mutation studies were available. The detection of any mutation (*MPL*, *TET2*, or *ASXL1*) was more frequently observed in patients with clonal *HUMARA* (eight mutations out of 20 clonal cases) than in those with polyclonal hematopoiesis (one case out of 23 polyclonal cases), the difference being statistically significant ($p=0.007$).

Patient outcome

According to age and history of thrombosis at diagnosis, 40 (55 %) and 33 (45 %) patients were classified in the high- and low-risk category, respectively. Initial treatment included observation ($n=19$), antiplatelet therapy ($n=15$), and cytoreductive medication ($n=39$). Eight patients, initially managed with a conservative approach, started on cytoreductive therapy at some time after diagnosis. The indication for cytoreductive therapy was age ($n=32$), thrombosis ($n=8$), extreme thrombocytosis ($n=4$), and bleeding ($n=3$). In those patients receiving cytoreductive therapy, a complete clinico-hematologic response, defined according to the European Leukemia Net criteria [19], was achieved in 28 (60 %) patients; whereas 15 (32 %) patients fulfilled a partial response, and 4 (8 %) patients did not achieve any type of response. Resistance and intolerance to hydroxyurea was registered in one and six

Table 2 Main clinical and hematological characteristics at diagnosis in 46 women with JAK2V617F-negative essential thrombocythemia according to the *HUMARA* gene analysis

	Polyclonal (n=25)	Clonal (n=21)	p
Age, years ^a	56 (21–78)	64 (39–88)	0.08
Cardiovascular risk factors, no. (%) ^b	18 (72)	9 (43)	0.07
ET-related symptoms, no. (%) ^c	9 (36)	3 (14)	0.09
History of thrombosis, no. (%)	4 (16)	1 (5)	0.3
Palpable splenomegaly, no. (%)	1 (4)	1 (5)	0.9
Hemoglobin, g/L ^a	135 (120–151)	129 (108–155)	0.1
WBC count, x10 ⁹ /L ^a	8.2 (4.8–13)	7.4 (5–9.7)	0.1
>10×10 ⁹ /L, no. (%)	7 (28)	0 (0)	0.01
Platelet count, x10 ⁹ /L ^a	759 (514–1472)	759 (559–1143)	0.7
>1000×10 ⁹ /L, no. (%)	9 (36)	1 (5)	0.01
<i>MPL</i> , <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i> mutations	1/23	8/20	0.007
Thrombosis, no. (%)	3 (12)	3 (14)	0.8
Bleeding, no. (%)	3 (12)	4 (19)	0.5
Myelofibrosis, no. (%)	0 (0)	5 (24)	0.01

The chi-square test was used to compare categorical variables between the groups and the Mann–Whitney *U* test or the *t* test for continuous variables

^a Median (range)

^b Presence of either smoking, diabetes, arterial hypertension, or hypercholesterolemia

^c Microvascular disturbances including erythromelalgia, headaches, paresthesia, and visual abnormalities

patients, respectively. No significant differences were observed in the rates of response, resistance, and intolerance according to the presence of myeloid clonality, by the detection of gene mutations or *HUMARA* assay with respect to patients without evidence of clonality.

With a median follow-up of 8 years (range 0.1–24), ten cases experienced thrombosis, resulting in a probability of thrombosis of 18 % at 10 years. Five patients on HU therapy in complete response according to ELN criteria experienced thrombosis. The remaining thrombotic events occurred in three patients on observation, one patient on antiplatelet therapy, and one patient with extreme thrombocytosis despite treatment with busulfan. Six thrombotic events were registered in the 46 female patients with informative *HUMARA* assay. There were no significant differences in the rate of thrombosis according to *HUMARA* clonality with three thrombotic events being recorded in both clonal and polyclonal cases (Fig. 1a). None of the patients who carried some of the mutations studied experienced thrombosis during follow-up. In contrast, 10 out of 47 patients without documented mutations had thrombosis during follow-up, the probability of thrombosis at 10 years being 22 % in

patients without mutations versus 0 % in patients with gene mutations ($p=0.08$, Fig. 1b). There were no statistically significant differences in the rate of thrombosis according to age, gender, history of thrombosis, presence of cardiovascular risk factors, or hematological values at diagnosis. Eight cases developed major bleeding, the probability of bleeding at 10 years being 16 %. There were no significant differences in the rate of major bleeding according to mutational status or *HUMARA* clonality.

Transformation of ET was documented in six cases, five of them evolved into myelofibrosis and the remaining one, to myelodysplasia. The main clinical and molecular characteristics of patients experiencing disease transformation are shown in Table 3. As can be seen, all cases evolving into myelofibrosis were females with clonal hematopoiesis demonstrated by *HUMARA* assay. In four out of these five cases, a mutation in *MPL* or *TET2* could be demonstrated. The patient who evolved into myelodysplasia was a male carrying mutations in both *TET2* and *ASXL1* genes. This latter patient had received cytoreductive therapy including one dose of radioactive phosphorus and 2 years of busulfan. In two of the patients who underwent myelofibrotic transformation, we also analyzed the sample corresponding to the diagnosis. In the first case, we detected the presence of the *MPL* mutation both at diagnosis and in the myelofibrotic phase; whereas in the second case, we failed to detect the *TET2* mutation by Sanger sequencing, at ET diagnosis. In the remaining three patients, DNA from diagnosis was not available. Regarding the patient who evolved to myelodysplasia, no mutations were detected at diagnosis by Sanger sequencing.

In the cases in which Sanger sequencing failed to detect mutations at the time of diagnosis, we performed NGS to increase the sensitivity of the mutational analysis. A mean of 1,000 reads per amplicon were obtained in all samples. In spite of this deep coverage, none of the mutations were detected in any case, suggesting that *TET2* and *ASXL1* mutations were acquired during the course of the disease. Nevertheless, DNA from the diagnosis in these two cases was obtained from archived bone marrow slides, which could result in underrepresentation of the tumoral cells impairing the detection of molecular alterations, in spite of using a very sensitive sequencing technique.

The probability of disease transformation at 10 years was higher in female patients with myeloid clonality by *HUMARA* assay (35 % in clonal cases versus 0 % in polyclonal cases, $p=0.004$; Fig. 2a). In addition, patients carrying any mutation in the *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* genes had also higher probability of disease transformation (2 % in patients without mutations versus 64 % in those with mutations, $p<0.001$; Fig. 2b). Seven patients died, resulting in a probability of survival at 7 years of 91 %. There were no significant differences in the probability of survival according to myeloid clonality by mutational status or *HUMARA* analysis.

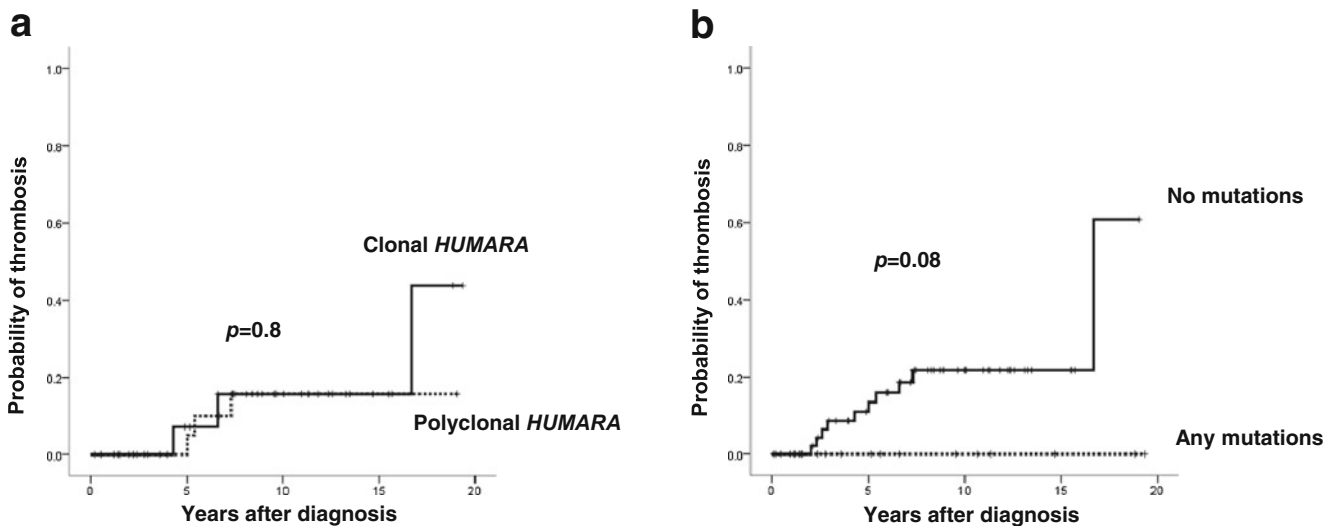


Fig. 1 **a** Probability of thrombosis according to *HUMARA* assay. **b** Probability of thrombosis according to the presence of mutations in either the *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* genes

Discussion

In the present study, we have analyzed the mutational status of *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* genes as well as XCIP by the *HUMARA* locus assay to demonstrate clonal hematopoiesis in a cohort of 73 JAK2V617F-negative ET patients. In addition, the clinical significance of clonality assessment was evaluated in terms of response to treatment and probability of thrombosis, bleeding, transformation, and survival.

We have detected clonality by the *HUMARA* assay in 41 % of female patients negative for the JAK2V617F mutation. There is only one previous study performed on JAK2V617F-negative ET showing a 22 % of clonal cases by *HUMARA* assay [7]. Regarding gene mutation rates, activating mutations in exon 10 of the *MPL* gene, encoding for the thrombopoietin receptor, have been described in 1–24 % of JAK2V617F-negative ET patients [8–11]. In our study, 10 % of JAK2V617F-negative ET patients presented *MPL* mutations. Of note, from the seven patients harboring

Table 3 Main clinical and molecular characteristics of patients with JAK2V617F-negative ET evolving into myelofibrosis or myelodysplasia

Case	Age/sex	CVRF	History of thrombosis	Hb g/dL	WBC $\times 10^9/L$	Platelet count $\times 10^9/L$	<i>HUMARA</i>	Mutated gene	Therapy	Response	Outcome
1	66/F	Yes	No	12.2	7.7	559	Clonal	<i>MPL</i>	HU+ASA	Complete	MF at 5 years, alive
2	65/F	No	No	13.3	7.6	749	Clonal	<i>TET2</i>	HU, Ag	Partial	MF at 10 years, alive
3 ^a	66/F	Yes	No	12.6	9.2	702	Clonal	<i>MPL</i>	None	NA	MF at 6 years, dead
4	59/F	No	No	12.0	7.4	644	Clonal	<i>TET2</i>	None	NA	MF at 14 years, alive
5	76/M	No	No	14.7	10.7	639	NA	<i>TET2</i> , <i>ASXL1</i>	Bu, P32	None	MDS at 10 years, dead
6	39/F	No	No	12.9	8.3	847	Clonal	None	HU+AC	None	MF at 3 years, alive

Age data correspond at ET diagnosis. Mutations were detected at the time of ET diagnosis (case 1), during the chronic phase (case 5) or at the time of transformation (cases 2,3, 4 and 6)

ET essential thrombocythemia, F female, M male, CVRF cardiovascular risk factors, MF myelofibrosis, MDS myelodysplasia, HU hydroxyurea, Ag anagrelide, Bu busulfan, P32 radioactive phosphorus, AC acenocumarol, ASA acetylsalicylic acid, NA not applicable

^a Case 3 displayed a normal karyotype at ET diagnosis with the del13q being detected at the time of myelofibrotic transformation. Response was assessed according to European LeukemiaNet criteria

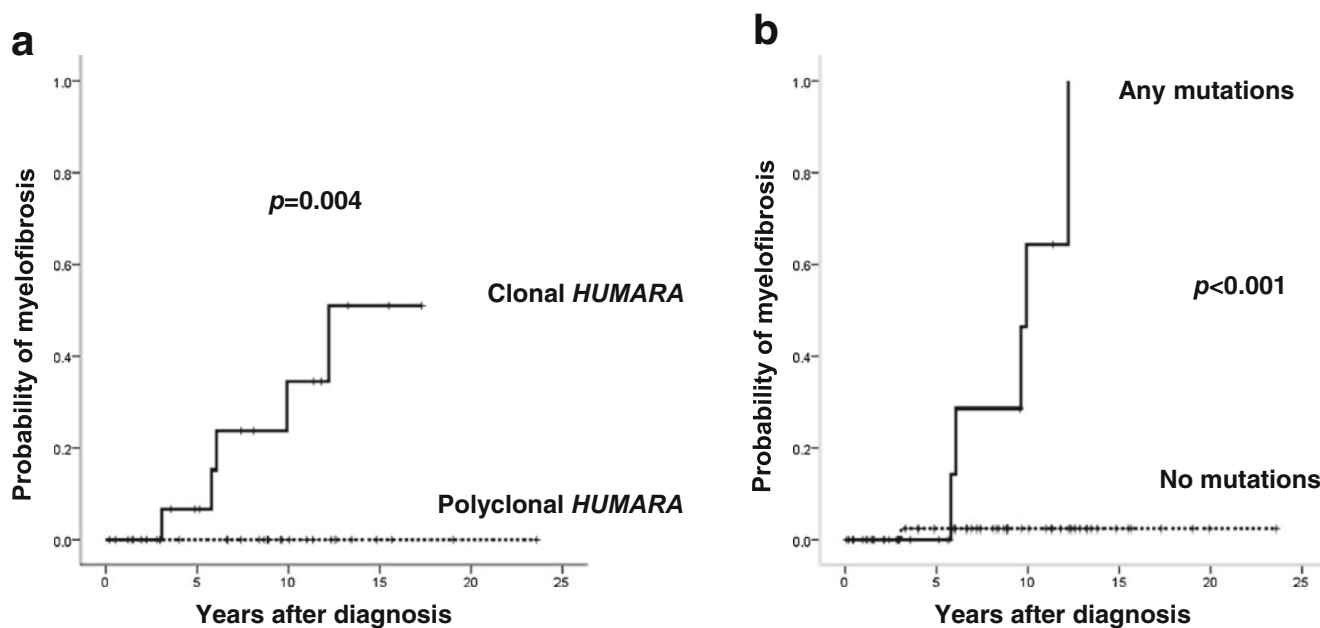


Fig. 2 **a** Probability of myelofibrosis according to *HUMARA* assay. **b** Probability of myelofibrosis according to the presence of mutations in either the *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* genes

alterations in this gene, five presented mutations in the classical W515 amino acid position, one presented the S505N mutation (also associated to hereditary thrombocytosis) [20], and one patient harbored the rare mutation p.W515_P518delinsK [21]. To the best of our knowledge, this is the second case reported with this mutation. As this alteration also affects the amphipathic motif of the MPL receptor, it is likely that this mutation contributes to the pathogenesis of the disease in this patient.

We observed *TET2* mutations in four out of 71 ET patients (6 %), a frequency similar to other studies reporting results on ET patients regardless of their *JAK2* mutational status [12–15]. Mutations in *ASXL1* have been reported in 8 % of *JAK2*-negative MPN patients with this percentage falling to less than 5 % when only ET patients are considered [12, 16]. Furthermore, Stein et al. [22] did not find *ASXL1* mutations in ET patients at the chronic phase of the disease. Accordingly, we have only detected *ASXL1* mutations in 3 % of *JAK2V617F*-negative ET patients.

Since ten out of 12 patients carrying mutations were females, we could study the relationship between the presence of clonal hematopoiesis determined by *HUMARA* assay and the probability of gene mutation detection. Interestingly, only one out of ten mutated cases showed polyclonal hematopoiesis, suggesting that the possibility of detecting mutations by Sanger sequencing is higher when the population of clonal granulocytes is representative enough to be detected by the *HUMARA* assay. In this sense, *HUMARA* analysis might be helpful in selecting female candidates with *JAK2V617F*-negative ET for further mutational investigation.

The most striking finding of the present study was the association of clonal hematopoiesis with disease transformation in this cohort of *JAK2V617F*-negative ET patients. To the best of our knowledge, this is the first study associating clonality with the probability of disease transformation in this group of patients. This association is illustrated by the fact that none of the women showing polyclonal hematopoiesis evolved into myelofibrosis, whereas the majority of transformed cases displayed clonal hematopoiesis demonstrated by either mutations in *MPL*, *TET2*, or *ASXL1* or by *HUMARA* clonality.

Nevertheless, this finding must be interpreted cautiously due to the retrospective nature of the study and the number of patients analyzed. It must be taken into account that DNA from transformed ET patients at diagnosis was only available in three mutated cases. In the first case, we detected the *MPL* mutation both at diagnosis and at the myelofibrotic phase, whereas in the remaining two patients, mutations were only detected at the time of transformation. These features indicate that the expansion of an undetectable mutated clone at diagnosis or the acquisition of a mutation during the evolution could be involved in the development of myelofibrotic transformation in some patients. According to these results, we cannot conclude whether the presence of a mutation at diagnosis is associated with transformation or rather if transformation is related to the acquisition of a mutation and expansion of the mutated clone during the course of the disease. This represents an important handicap for taking the decision of performing the mutation screening of *MPL*, *TET2*, and *ASXL1* genes in the routine diagnosis of *JAK2V617F*-negative ET patients.

In addition, the absence of thrombotic complications observed in patients harboring mutations must be pointed out. This was an unexpected result that must be interpreted cautiously since thrombosis is a multifactorial process in which, besides ET-dependent factors, operate multiple mechanisms such as age, cardiovascular risk factors, history of thrombosis, and type of treatment administered. It must be taken into consideration that the statistical power of the present study is limited by series size, the number of events, and, in the case of mutations, uncertainty of the moment of acquisition. Confirmatory studies with a larger number of patients are needed in order to assess by multivariate analysis the risk of thrombosis and transformation associated with clonality or mutations in patients with JAK2V617F-negative ET. Finally, we could not identify any significant association between the presence of mutations or *HUMARA* clonality and response to cytoreductive treatment, resistance, or intolerance to hydroxyurea, or the development of major bleeding.

In summary, according to our results, myelofibrotic transformation is associated with demonstration of clonal hematopoiesis by the presence of mutations in either *MPL*, *TET2*, or *ASXL1*, or by the *HUMARA* assay, in JAK2-negative ET patients.

Acknowledgements This work was supported by grants from the Spanish Health Ministry Fondo de Investigación Sanitaria EC 10-136, PI10/01807, AECC Cataluña 2011, Instituto de Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036), and the Xarxa de Bancs de Tumors sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya. Luz Martínez-Avilés received a fellowship from the Comissionat per a Universitats i Recerca del departament d' Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.

References

1. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM (2005) Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 19:1847–1849
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779–1790
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387–397
5. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupre N, Skoda RC, Hermouet S (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 108:1865–1867
6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937–951
7. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahreich D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque LX (2006) X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAKV617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal haematopoiesis. *Blood* 107:4139–4141
8. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T (2008) Characteristics and clinical correlates of MPL 515 W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 112:844–847
9. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR (2008) MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 112:141–149
10. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, Huntly B, Erber WN (2010) Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 149:250–257
11. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108:3472–3476
12. Abdel-Wahab O (2011) Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 18:117–123
13. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL (2009) Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114:144–147
14. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert AA, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360:2289–2301
15. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL (2009) TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23:905–911
16. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ (2009) Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 23:2183–2186
17. Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Bellosillo B, Sole F (2005) Clonality analysis by HUMARA assay in Spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Haematologica* 90:259–261

18. Martínez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larran A, Torres E, Serrano S, Bellosillo B (2011) TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 91(4):533–41
19. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Kiladjian JJ, Lengfelder E, McMullin MF, Passamonti F, Reilly JT, Vannucchi AM, Barbui T (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 113:4829–4833
20. Ghilardi N, Wiestner A, Kikuchi M, Oshaka A, Skoda RC (1999) Hereditary thrombocythemia in a Japanese family is caused by a novel point mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol* 107:310–316
21. Ohashi H, Arita K, Fukami S, Oguri K, Nagai H, Yokozawa T, Hotta T, Hanada S (2009) Two rare MPL gene mutations in patients with essential thrombocythemia. *Int J Hematol* 90:431–432
22. Stein B, Williams DM, O'Keefe C, Ingersll R, Spivak JL, Verma A, Maciejewski JP, McDevitt MA, Moliterno A (2011) Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica* 96:1462–1469

3.2.1. Anexo al Trabajo II

3.2.1.1. Reevaluación de los resultados obtenidos en el Trabajo II considerando el estado mutacional del gen *CALR*

Introducción

Este segundo trabajo se realizó en el año 2011, momento en el cual la mutación de JAK2V617F era el marcador molecular más frecuentemente detectado en la TE (65% de los casos). Este trabajo se centró en el estudio de una cohorte de 73 pacientes con TE JAK2V617F negativos, en los que se tuvo como objetivo estudiar si la detección de una hematopoyesis clonal, ya fuera mediante el estudio del PICX analizando el polimorfismo del gen *HUMARA* (en mujeres) o la detección en mutaciones en otros genes distintos a *JAK2*, como *MPL*, *TET2* y *ASXL1*, tenía algún significado clínico, respecto a los pacientes en los que no se detectaba una hematopoyesis clonal.

La principal observación del estudio fue que la probabilidad de transformación de la enfermedad a los 10 años era superior en pacientes que mostraban una hematopoyesis clonal ya fuera presentando mutaciones en *MPL*, *TET2* y *ASXL1* como mediante la detección de un resultado positivo en el análisis del polimorfismo del gen *HUMARA*, indicando que existe asociación entre la detección de una hematopoyesis clonal y la transformación de la enfermedad en el grupo de pacientes con TE JAK2V617F negativos.

Tras la descripción de las mutaciones en el gen *CALR*, se reevaluaron los análisis realizados en este estudio ya que, según lo publicado, un elevado porcentaje de pacientes con TE *JAK2* negativos presentan alteraciones en el gen *CALR*, por lo que era esperable que un porcentaje elevado de pacientes de esta cohorte presentaran este marcador de clonalidad no identificado hasta el momento.

Objetivo

Los objetivos de este anexo al trabajo fueron: a) determinar la incidencia de mutaciones en *CALR* en la cohorte de pacientes con TE JAK2V617F negativa previamente estudiada b) Reevaluar el principal hallazgo del segundo trabajo teniendo en cuenta el estado mutacional del gen *CALR* en la cohorte de TE JAK2V617F negativas y analizar si se mantenía la asociación entre la detección de una hematopoyesis clonal y la probabilidad de transformación mielofibrótica.

Material y Métodos

En el análisis se incluyó la cohorte estudiada en el segundo trabajo que consistía en 73 pacientes con TE sin la mutación JAK2V617F.

El estudio mutacional del exón 9 del gen *CALR* se realizó mediante PCR utilizando un *primer reverse* marcado con 6-carboxifluoresceína y posterior análisis de fragmentos en un secuenciador 3500DX (Applied Biosystems).

El análisis estadístico se realizó mediante el método Kaplan-Meier seguido del test de *log-rank*. La significación estadística se consideró para los valores de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL).

Resultados

De los 73 pacientes incluidos, se realizó el análisis mutacional del exón 9 del gen *CALR* en 66 pacientes de los que se disponía de ADN restante. De éstos, 33 de ellos presentaban mutaciones en el gen *CALR* representando una frecuencia del 50% del total las TE JAK2V617F negativas evaluadas. Como se describió en el segundo trabajo, 7 de los 73 (10%) pacientes presentaban mutaciones en el gen *MPL*, y en 32 pacientes no se detectaron mutaciones en los genes *JAK2*, *CALR* ni *MPL*, con lo que un 48% de la serie en la que se pudo analizar los tres genes, eran pacientes triples negativos. En todos los pacientes que presentaban mutaciones en genes como *TET2* o *ASXL1*, estas mutaciones coexistían con la mutación tipo 1 del gen *CALR*.

En análisis estadístico se realizó en base a los 66 pacientes con TE JAK2V617F negativos en los que se pudieron analizar todos los genes. De igual manera que en el trabajo original, se hicieron dos grupos de pacientes: aquellos que presentaban alguna mutación en los genes analizados (*MPL*, *TET2*, *ASXL1* y *CALR*) y por otro lado los pacientes que no presentaban ninguna mutación en estos genes. Los resultados confirmaron que no había asociación estadísticamente significativa entre presentar mutaciones o no y el riesgo de padecer eventos trombóticos ($p=0,86$) o hemorrágicos ($p=0,44$). En cuanto al riesgo de transformación de la enfermedad, al incorporar al análisis el resultado del estado mutacional de *CALR* de estos pacientes, no se confirmó la significación estadística ($p=0,074$) aunque se mantenía una tendencia entre la detección de mutaciones y el riesgo de transformación de la enfermedad ya fuera a mielofibrosis o mielodisplasia.

Todos los pacientes que evolucionaron a mielofibrosis tenían mutaciones en *MPL* o *CALR* y, en algunos casos, también presentaban coexistencia de mutaciones en *TET2*. Todos los pacientes *CALR* positivos, que presentaron transformación de la enfermedad, eran portadores de la mutación tipo 1, con lo cual se reanalizaron los resultados para ver si el hecho de presentar unas mutaciones determinadas como mutaciones en *MPL* o la mutación tipo 1 de *CALR* estaba asociado a un mayor riesgo de transformación de la enfermedad respecto a los pacientes que presentaran otras mutaciones. El análisis estadístico mostró que los pacientes con mutaciones en *MPL* o *CALR* tipo 1, *TET2* o *ASXL1* tenían mayor riesgo de transformación respecto a los pacientes que presentaban otro tipo de mutación en *CALR* o que no presentaban ninguna mutación en los genes analizados, y esta asociación fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Conclusiones

La detección de una hematopoyesis clonal mediante el análisis de mutaciones en los genes *MPL*, *CALR*, *TET2* y *ASXL1*, en pacientes con TE negativos para la mutación JAK2V617F, parece asociarse a un mayor riesgo de transformación de la enfermedad a mielofibrosis o mielodisplasia.

3.2.1.2. Actualización de las alteraciones moleculares detectadas en los pacientes con TE JAK2V617F negativos que evolucionaron a mielofibrosis o mielodisplasia, descritos en el Trabajo II.

Con posterioridad a la publicación del Trabajo II, se amplió el estudio mutacional de los pacientes con TE JAK2V617F negativos, en los que se analizó la presencia de mutaciones en el gen *CALR*, y de los genes *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*, en los pacientes con PV o TE evolucionados a mielofibrosis. Como resultado de esos análisis se detectaron nuevas mutaciones en los pacientes incluidos inicialmente en el Trabajo II. A continuación se muestra la actualización de las mutaciones detectadas en este grupo de pacientes (Tabla 13).

RESULTADOS

Tabla 13: Actualización de las características principales de los pacientes con TE JAK2V617F negativos que evolucionaron a mielofibrosis o mielodisplasia

Caso	Edad/Sexo	FRCV	Leucocitos X10 ⁹ L	Plaquetas X10 ⁹ L	HUMARA	Genes Mutados	Terapia	Respuesta	Transformación Tiempo
1	66/M	Sí	12,2	559	Clonal	<i>MPL</i>	HU+ASA	Completa	MF, 5 años
2	65/M	No	13,3	749	Clonal	<i>TET2, CALR</i>	HU, Ag	Parcial	MF, 10 años
*3	66/M	Sí	12,6	702	Clonal	<i>MPL SF3B1</i>	-	NA	MF, 6 años
4	59/M	No	12	644	Clonal	<i>TET2 CALR</i>	-	NA	MF, 14 años
5	76/H	No	14,7	639	NA	<i>TET2, ASXL1</i>	BU, ³² P	No respuesta	SMD, 10 años
6	39/M	No	12,9	847	Clonal	<i>CALR</i>	HU+AC	No respuesta	MF, 3 años

M: Mujer; H: Hombre; AC: Acenocumarol; Ag: Anagrelida; ASA: Ácido Acetilsalicílico ; FRCV: Factores de riesgo cardiovascular; HU: Hidroxiurea; MF: Mielofibrosis; SMD: Síndrome Mielodisplásico

La edad corresponde a la de la fecha del diagnóstico de TE. Las mutaciones se detectaron en el momento del diagnóstico (caso 1 y 6), durante la fase crónica (caso 5) y en el momento de la transformación (caso 2,3 y 4)

*Esta paciente presentaba un cariotipo normal en el momento del diagnóstico de TE, pero la alteración citogenética del13q, en el momento de la transformación

La respuesta se valoró acorde a los criterios de la *European Leukemia NET*²⁸²

3.3. ANEXO: TRABAJO III

Mutaciones en los genes de la maquinaria del *splicing* del ARN en la transformación mielofibrótica de la trombocitemia esencial y la policitemia vera

L. Martínez-Avilés, C. Besses, A. Álvarez-Larrán, L. Camacho, S. Pairet, C. Fernández-Rodríguez, S. Serrano, B. Bellosillo.

Se han descrito mutaciones en genes que codifican para varias subunidades del *spliceosoma*, incluyendo *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*, en neoplasias hematológicas que afectan tanto al linaje linfoide como mieloide. Dentro de las neoplasias mieloproliferativas clásicas, principalmente se han descrito mutaciones en pacientes con MFP, en *SF3B1* (6%) y *SRSF2* (17%). Las mutaciones en *SRSF2* también se detectan con frecuencia en las NM que evolucionan a LAM (19%), asociándose a mal pronóstico. La información sobre la incidencia de alteraciones en estos genes en pacientes con TE o PV que evolucionan a mielofibrosis es limitada.

En este estudio se realizó el análisis mutacional de *SF3B1* (exones 14 y 15), *SRSF2* (exón 1) y *U2AF1* (exones 2, 6 y 7) en 22 PV y 14 TE que se transformaron a MF (Tabla 16), 27 MFP, 30 PV y 30 TE en fase crónica, mediante pirosecuenciación en un secuenciador 454 GSJunior (NGS).

De los 36 pacientes que evolucionaron a MF, se identificó 1 paciente con una mutación en *SRSF2* (3%), 3 pacientes con mutaciones en *SF3B1* (8%) y ningún paciente con mutaciones en *U2AF1* (0%). El paciente con la mutación en *SRSF2* presentaba, simultáneamente, una mutación en *SF3B1* (Tabla 14).

La muestra del diagnóstico de una paciente con TE ocho años previos a la transformación, mostró la presencia de la mutación de *SF3B1* en un 2,4% de las secuencias obtenidas, en contraste con el 45% observado en la muestra correspondiente al momento de la transformación, sugiriendo la expansión de la clona durante la evolución de la enfermedad. Por otro lado, el paciente con MF post-PV presentaba una carga de las mutaciones en *SF3B1* y *SRSF2* similar, tanto en el momento del diagnóstico como dos años después en la transformación mielofibrótica.

La prevalencia de mutaciones en las cohortes de PV y TE en fase crónica fue muy baja, detectándose únicamente coexistencia de dos alteraciones en *SRSF2* (p.R94P y p.P95H) en un paciente con TE (Tabla 14). Sin embargo, la detección de una pequeña clona *SF3B1* positiva al diagnóstico, que se expande durante la transformación

RESULTADOS

mielofibrótica en una paciente con TE, sugeriría que, en algunos casos, la presencia de mutaciones en fase crónica puede tener un papel en la progresión de la enfermedad.

Para determinar si la prevalencia de mutaciones en la mielofibrosis secundaria era comparable a la de MFP, se analizó la presencia de mutaciones en 27 pacientes con MFP (Tabla 17). En este grupo de pacientes, se observó una incidencia de mutaciones mayor, detectándose mutaciones en *SRSF2* en 6 casos (22%), *SF3B1* en 2 casos (7%) y *U2AF1* en 4 casos (15%) (Tabla 14).

Aunque el número de pacientes analizados es limitado, parece que existe una diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de mutaciones en *SRSF2* y *U2AF1* entre los pacientes con MFP y los pacientes con MF secundaria, mientras que no parece haber diferencias en la incidencia de mutaciones en *SF3B1* entre ambos grupos, tal y como se ha reportado en publicaciones anteriores²²⁶.

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que existe un perfil de mutaciones distinto, de los genes de la maquinaria del *splicing*, entre los pacientes con MFP y los pacientes con MF post-TE y MF post-PV.

Tabla 14: Frecuencias detectadas en los genes de la maquinaria del *splicing* en pacientes con MPF, TE y PV en fase crónica y en MF post-PV y MF post-TE

	Mutaciones <i>SRSF2</i> n (%)	Mutaciones <i>SF3B1</i> n (%)	Mutaciones <i>U2AF1</i> n (%)
MF post-PV y MFpost-TE n=36	1 (3%)	3 (8%)	0
MFP n=27	6 (22%)*	2 (7%)	4 (15%)*
TE n=30	1 (3%)#	0	0
PV n=30	0	0	0

* $p < 0,05$ comparado con la frecuencia en todas las otras entidades

Paciente en el que se detectaron dos mutaciones en *SRSF2* en fase crónica y que evolucionó a LAM a los 8 años tras el diagnóstico.

Mutations in the RNA splicing machinery genes in myelofibrotic transformation of essential thrombocythaemia and polycythaemia vera

Mutations in mRNA splicing machinery genes, including *SF3B1*, *SRSF2* and *U2AF1*, have been recently described in lymphoid and myeloid haematopoietic malignancies (Maciejewski & Padgett, 2012; Cazzola *et al*, 2013). Regarding the myeloproliferative neoplasms (MPN), alterations in the *SF3B1* gene have been reported in essential thrombocythaemia (ET, 3%) and primary myelofibrosis (PMF, 4-6%) (Brecqueville *et al*, 2012; Lasho *et al*, 2012a; Maciejewski & Padgett, 2012; Cazzola *et al*, 2013). *SRSF2* mutations, which have been associated with adverse outcome, have been detected in 17% of PMF and in 19% of MPN that evolve to acute leukaemia (Lasho *et al*, 2012b; Zhang *et al*, 2012; Vannucchi *et al*, 2013). Concerning *U2AF1*, mutations have been reported in 3% of PMF (Zhang *et al*, 2012). Although mutations in these genes have been described in PMF and, in some cases, associated with adverse outcome, there is limited information about their incidence in patients with ET or polycythaemia vera (PV) who develop myelofibrotic transformation during the evolution of the disease.

SF3B1 (exons 14 and 15), *SRSF2* (exon 1) and *U2AF1* (exons 2, 6 and 7) were analysed in 22 PV and 14 ET patients who transformed to myelofibrosis and 27 PMF, 30 ET and 30 PV patients in chronic phase. Diagnosis of ET, PV and PMF was determined according to the 2008 World Health Organization criteria (Vardiman *et al*, 2009). Pre-fibrotic MF was excluded by histomorphological criteria. Post-ET and post-PV MF patients were diagnosed according to the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT) guidelines (Barosi *et al*, 2008). Screening for mutations was performed on granulocyte DNA at the myelofibrotic phase of the disease using Next Generation Sequencing (NGS; 454GSJunior platform, Roche, Mannheim, Germany). Mutations were confirmed by independent polymerase chain reaction amplification and Sanger sequencing. The study was approved by the local Ethics Committee and patients provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki.

From the 36 PV or ET patients who evolved to myelofibrosis, we identified 1 *SRSF2* (3%), 3 *SF3B1* (8%) and no *U2AF1* (0%) mutations (Fig 1, Table I). Two post-ET MF patients harboured the *SF3B1* p.K666N mutation and one post-PV MF patient simultaneously carried a *SRSF2* mutation (p.P95H) and a *SF3B1* mutation (p.I671T) (Fig 1,

Table I). As the *SF3B1* p.I671T mutation has not been previously described, a prediction of its possible impact on the structure and function of the protein was analysed using the PolyPhen, Align GVDG and SIFT bioinformatic tools. All three analyses predicted that this change probably results in protein function damage. A diagnostic sample from one of the two post-ET MF patients harbouring the p.K666N mutation, 8 years before transformation, showed the presence of the p.K666N mutation by NGS in 2-4% of sequences, in contrast to the 45% observed in the sample at the time of transformation, suggesting expansion of the clone during the evolution of the disease. On the other hand, a diagnostic sample from the post-PV MF patient, 2 years before transformation, showed a similar percentage of both *SF3B1* and *SRSF2* mutations.

The prevalence of mutations in 30 PV and 30 ET patients at chronic phase was very low with only 1/30 ET patients (3%) showing two simultaneous *SRSF2* mutations (p.R94P and p.P95H). No mutations in these genes were detected in PV patients (Table I). However, the presence of a small clone with the *SF3B1* mutation at diagnosis that expanded during the transformation of the disease in one post-ET MF patient, suggests that, at least in some cases, the presence of mutations in splicing machinery genes at chronic phase might play a role in myelofibrotic transformation. Nevertheless, larger studies including sequential mutational studies at diagnosis and during follow-up are needed to confirm the frequency and the role of splicing machinery gene mutations in myelofibrotic transformation of PV and ET patients.

To determine whether the prevalence of mutations in myelofibrotic transformation was comparable to PMF, we analysed these genes in 27 PMF patients. In PMF, we detected mutations in *SRSF2* in 6 cases (22%), *SF3B1* in 2 patients (7%) and *U2AF1* in 4 patients (15%) (Table I). All *SRSF2* mutations affected the hotspot P95 amino acid position (p.P95H ($n = 3$), p.P95R ($n = 2$) and p.P95_R103delinsR ($n = 1$)). The two PMF patients positive for *SF3B1* mutations presented the p.K666N mutation, and all mutations affecting the *U2AF1* gene were detected at amino acid position Q157 (p.Q157P ($n = 2$) and p.Q157R ($n = 2$)) (Fig 1, Table I).

Our results identified *SRSF2* mutations in 1/36 patients (3%) with myelofibrotic transformation, in contrast to 6/27

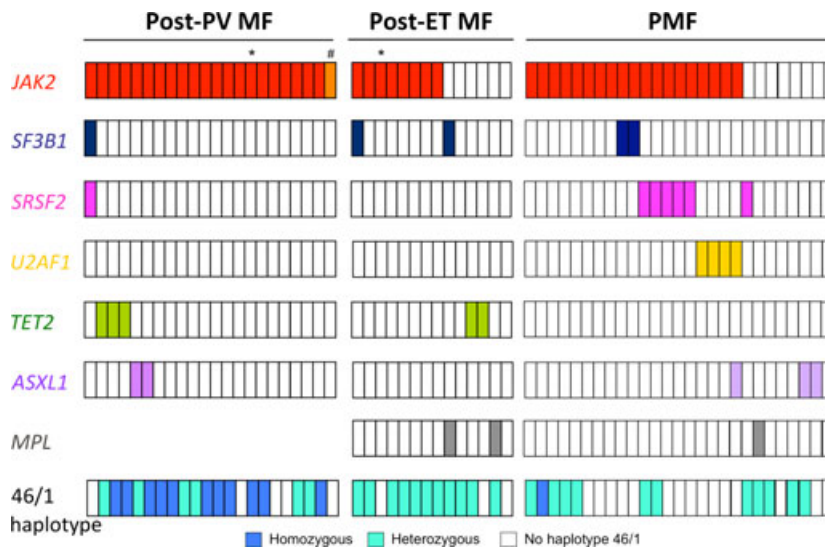


Fig 1. Distribution of mutations identified in PMF and Post-ET and Post-PV MF patients. Patients were analysed for mutations in *JAK2* (p.V617F, exon 12-in PV patients), *MPL* (exon 10), *TET2* (whole coding sequence), *ASXL1* (exon 12), *SRSF2* (exon 1), *SF3B1* (exons 14-15), *U2AF1* (exons 2,6-7), *IDH1* (p.R132) and *IDH2* (p.R140 and p.R172). Post-ET and Post-PV MF patients were also screened for *TP53* (exons 2-11) and *c-CBL* (exons 8-9) mutations. *Patient harboured a *TP53* mutation. #Patient harboured a *JAK2* exon12 mutation. 46/1 haplotype status: homozygous (dark blue), heterozygous (light blue), no 46/1 haplotype (white). PMF, primary myelofibrosis; ET, essential thrombocythaemia; PV, polycythaemia vera; MF, myelofibrosis.

Table I. Incidence of *SRSF2*, *SF3B1* and *U2AF1* mutations in patients with post-ET and post-PV myelofibrosis, primary myelofibrosis and chronic phase essential thrombocythaemia and polycythaemia vera.

	<i>SRSF2</i> mutations <i>n</i> (%)	<i>SF3B1</i> mutations <i>n</i> (%)	<i>U2AF1</i> mutations <i>n</i> (%)
Post-ET and Post-PV Myelofibrosis <i>N</i> = 36	1 (3%)	3 (8%)	0
Primary Myelofibrosis <i>N</i> = 27	6 (22%)*	2 (7%)	4 (15%)*
ET <i>N</i> = 30	1 (3%)	0	0
PV <i>N</i> = 30	0	0	0

* $P < 0.05$ compared with frequency in all other diseases.

ET, essential thrombocythaemia; PV, polycythaemia vera.

(22%) PMF patients with *SRSF2* mutations ($P = 0.021$). Similar results were observed regarding *U2AF1* (0% versus 15%, $P = 0.029$). Although our cohort size is limited, there seems to be a significantly different incidence of mutations in *SRSF2* and *U2AF1* between PMF and secondary MF, whereas no differences between these groups were detected regarding *SF3B1* mutations, in agreement with other series (Lasho *et al*, 2012a). Some studies have reported the presence of *SF3B1* mutations in ET and post-ET myelofibrosis, but, so far, none of them had previously described mutations in post-PV myelofibrosis (Brecqueville *et al*, 2012). Although there is limited information about the biological consequences of alterations in the spliceosome genes, mutations in *U2AF1* were recently associated with alterations in the splicing pattern of genes involved in cell cycle progression or RNA processing, and it was

hypothesized that these missplicing patterns are potential leukaemogenic events (Przychodzen *et al*, 2013).

No significant association was observed between the presence of spliceosome gene mutations and overall survival, probably due to the limited cohort size. Only the International Prognostic Scoring System score was significantly associated with overall survival ($P = 0.001$).

In summary, we have found a low percentage of pathogenic mutations in *SRSF2* and *SF3B1* genes, and absence of *U2AF1* mutations in patients with post-PV and post-ET MF. This was in contrast to PMF patients, in which a higher incidence of mutations in *SRSF2* and *U2AF1* genes was observed. Our findings suggest a different profile of mutations in the RNA splicing machinery genes between PMF and post-ET and post-PV MF patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Health Ministry “Fondo de Investigación Sanitaria” EC 10-136, PI10/01807, AECC Cataluña 2011, 2009SGR929, Instituto de Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036 and RD12/0036/0010) and the “Xarxa de Bancs de Tumors sponsored by Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC)”. Luz Martínez-Avilés received a fellowship from the “Comissionat per a Universitats i Recerca del departament d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu”.

Author contributions

LMA performed the research, designed the research study, analysed and interpreted the data and wrote the paper. CB and AAL designed the research study, analysed and interpreted the data and wrote the paper. LC and SP performed molecular studies and approved the final version of the manuscript. CFR and SS collected the data and approved the final version of the manuscript. BB designed the research study, performed the statistical analysis analysed, interpreted the data and wrote the paper.

References

- Barosi, G., Mesa, R.A., Thiele, J., Cervantes, F., Campbell, P.J., Verstovsek, S., Dupriez, B., Levine, R.L., Passamonti, F., Gotlib, J., Reilly, J.T., Vannucchi, A.M., Hanson, C.A., Solberg, L.A., Orazi, A. & Tefferi, A.; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT) (2008) Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*, **22**, 437–738.
- Brecqueville, M., Rey, J., Bertucci, F., Coppin, E., Finetti, P., Carbuccia, N., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Gisserot, O., Verrot, D., Slama, B., Vey, N., Mozziconacci, M.J., Birnbaum, D. & Murati, A. (2012) Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **51**, 743–755.
- Cazzola, M., Rossi, M., Malcovati, L.; associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative (2013) Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*, **121**, 260–269.
- Lasho, T.L., Finke, C.M., Hanson, C.A., Jimma, T., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2012a) SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: Clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia*, **26**, 1135–1137.
- Lasho, T.L., Jimma, T., Finke, C.M., Patnaik, M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2012b) SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*, **120**, 4168–4171.
- Maciejewski, J.P. & Padgett, R.A. (2012) Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukemogenesis. *British Journal of Haematology*, **158**, 165–173.
- Przychodzen, B., Jerez, A., Guinta, K., Sekeres, M.A., Padgett, R., Maciejewski, M.P. & Makishima, H. (2013) Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*, **122**, 999–1006.
- Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, O., Biamonte, F., Pardanani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., Ketterling, R.P., Rotunno, G., Knudson, R.A., Susini, M.C., Laborde, R.R., Spolverini, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Manfredini, R., Tagliafico, E., Zini, R., Jones, A., Zoi, K., Reiter, A., Duncombe, A., Pietra, D., Rumi, E., Cervantes, F., Barosi, G., Cazzola, M., Cross, N.C. & Tefferi, A. (2013) Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*, **27**, 1861–1869.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A. & Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, **114**, 937–951.
- Zhang, S.J., Rampal, R., Manshour, T., Patel, J., Mensah, N., Kayserian, A., Hricik, T., Heguy, A., Hedvat, C., Gonen, M., Kantarjian, H., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. & Verstovsek, S. (2012) Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*, **119**, 4480–4485.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Luz Martínez-Avilés^{1,2,3}

Carles Besses^{3,4}

Alberto Álvarez-Larrán^{2,3,4}

Laura Camacho³

Silvia Pairet^{1,3}

Concepción Fernández-Rodríguez³

Sergi Serrano^{1,2}

Beatriz Bellosillo^{1,3,5}

¹Department of Pathology, Hospital del Mar-IMIM, ²Universitat Autònoma de Barcelona, ³Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques-Hospital del Mar-IMIM, ⁴Department of Haematology, Hospital del Mar-IMIM, and ⁵Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

E-mail: cbesses@parcdesalutmar.cat

Keywords: essential thrombocythemia, myelofibrosis, polycythemia vera, mutation analysis

3.3.1. Material suplementario

3.3.1.1. Mutaciones en genes adicionales a *JAK2* en pacientes con MF post-PV y MF post-TE

En los pacientes con MF post-PV y MF post-TE también se analizó la presencia de mutaciones en *TET2* (secuencia codificante), *ASXL1* (exón 12), *SRSF2* (exón 1), *SF3B1* (exones 14-15), *U2AF1* (exones 2, 6 y 7), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 y R172) and *TP53* (exones 2-11). En los casos *JAK2* negativos se realizó el análisis del *CALR* (exón 9). La frecuencia de mutaciones observada se resume en la [Tabla 15](#).

Tabla 15: Frecuencia de mutaciones en los genes analizados en pacientes con MF post-PV y MF-post-TE

	MF post-PV n=22	MF post-TE n=14
<i>JAK2</i>	100%	57%
<i>TET2</i>	14%	14%
<i>ASXL1</i>	9%	0%
<i>MPL</i>	ND	14%
<i>CALR</i>	ND	28%
<i>IDH1</i>	0%	0%
<i>IDH2</i>	0%	0%
<i>TP53</i>	4,5%	7%
<i>SRSF2</i>	4,5%*	0%
<i>SF3B1</i>	4,5%*	14%
<i>U2AF1</i>	0%	0%

ND: No Determinado

*Un paciente presentaba coexistencia de mutaciones en *SRSF2* y *SF3B1*

3.3.1.2. Características clínico-biológicas de los pacientes con MF post-PV o MF post-TE.

Tabla 16: Características clínico-biológicas de los pacientes con MF post-PV o MF post-TE

Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Hgb [§]	Leucocitos [§]	Plaquetas [§]	*JAK2	*Mutaciones en otros Genes	Haplotipo <i>JAK2</i> 46/1	**Tiempo hasta la transformación
1	82/H	PV	157	15,4	734	V617F	<i>SF3B1</i> (p.I671T) <i>SRSF2</i> (p.P95H)	No	1,6
2	69/M	PV	166	12,1	479	V617F	<i>TET2</i> (p.K1827fs)	Heterocigoto	11,8
3	53/H	PV	223	11,5	252	V617F	<i>TET2</i> (p.Y192fs)	Homocigoto	14,4
4	51/M	PV	184	7,2	155	V617F	<i>TET2</i> (p.T229fs)	Homocigoto	1,4
5	74/H	PV	180	11,7	660	V617F	<i>ASXL1</i> (p.Y591X)	Heterocigoto	8,8
6	50/H	PV	182	21,5	416	V617F	<i>ASXL1</i> (p.L765fs)	Homocigoto	15,5
7	63/M	PV	181	13,6	250	V617F	-	Homocigoto	16,3
8	60/H	PV	173	10,9	590	V617F	-	Homocigoto	13,5
9	45/M	PV	180	6,2	501	V617F	-	Heterocigoto	9
1	56/H	PV	223	15,2	815	V617F	-	Heterocigoto	11,7
11	68/H	PV	201	11,1	446	V617F	-	Homocigoto	6,1
12	59/H	PV	173	14,3	1400	V617F	-	Homocigoto	10,4
13	50/M	PV	139	10,2	514	V617F	-	Homocigoto	3,4
14	65/M	PV	158	8,8	373	V617F	-	No	3,7
15	70/H	PV	200	9,5	458	V617F	<i>TP53</i> (p.R273H)	Homocigoto	9,9
16	62/H	PV	210	8,1	297	V617F	-	Homocigoto	4,3
17	48/H	PV	137	19	659	V617F	-	No	4,6

Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Hgb [§]	Leucocitos [§]	Plaquetas [§]	*JAK2	*Mutaciones en otros Genes	Haplotipo <i>JAK2</i> 46/1	**Tiempo hasta la transformación
18	70/M	TE	135	14,4	960	V617F	-	No	19,1
19	60/M	PV	188	10,8	434	V617F	-	Heterocigoto	13
20	47/M	PV	172	12,10	434	V617F	-	Heterocigoto	4,4
21	58/M	PV	189	15,2	423	V617F	-	Homocigoto	14,8
22	40/M	PV	181	12,7	398	Exón 12 (p.H538_K539delinsL)	-	No	22,6
23	66/M	TE	146	10,4	805	V617F	<i>SF3B1</i> (p.K666N)	Heterocigoto	8,4
24	62/M	TE	150	9,9	827	V617F	-	Heterocigoto	9,1
25	63/M	TE	127	5,3	694	V617F	<i>TP53</i> (p.M237I)	No	12,9
26	71/H	TE	158	11,7	813	V617F	-	Heterocigoto	5,6
27	74/M	TE	121	4,7	912	V617F	-	Heterocigoto	11
28	48/M	TE	118	23,7	2814	V617F	-	Heterocigoto	3,1
29	65/H	TE	159	4,4	890	V617F	-	Heterocigoto	10
30	35/M	PV	120	15	1017	V617F	-	Heterocigoto	15,6
31	66/M	TE	126	9,2	702	No Mutado	<i>MPL</i> (p.W515L), <i>SF3B1</i> (p.K666N)	Heterocigoto	6
32	66/M	TE	122	7,3	559	No Mutado	<i>MPL</i> (p.W515_P518delinsKT)	Heterocigoto	5,7
33	65/M	TE	133	7,6	749	No Mutado	<i>TET2</i> (p.P463fs), <i>CALR</i>	Heterocigoto	9,9
34	59/M	TE	120	7,4	644	No Mutado	<i>TET2</i> (p.Q706X) <i>CALR</i>	No	12,2
35	70/H	TE	148	11,6	834	No Mutado	<i>CALR</i>	Heterocigoto	9,7

Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Hgb [§]	Leucocitos [§]	Plaquetas [§]	*JAK2	*Mutaciones en otros Genes	Haplotipo <i>JAK2</i> 46/1	**Tiempo hasta la transformación
36	39/M	TE	129	8,3	847	No Mutado	<i>CALR</i>	No	3,1

PV: Policitemia Vera; TE: Trombocitemia Esencial; M: Mujer; H: Hombre; [§] Valores Hematológicos al diagnóstico. Hgb: hemoglobina (g/L), Leucocitos: (x10⁹/L), Plaquetas (x10⁹/L)

En todos los pacientes se realizó el análisis de mutaciones de *JAK2* (V617F, exon 12), *MPL* (exon 10), *TET2* (secuencia codificante), *ASXL1* (exón 12), *SRSF2* (exón 1), *SF3B1* (exones 14-15), *U2AF1* (exones 2,6-7), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 y R172) y *TP53* (exones 2-11). En los casos *JAK2* negativos se realizó el análisis de *CALR* (exón 9)

** Tiempo hasta la transformación mostrado en años

3.3.1.3. Características clínico-biológicas de los pacientes con MFP

Tabla 17: Características clínico-biológicas de los pacientes con MFP

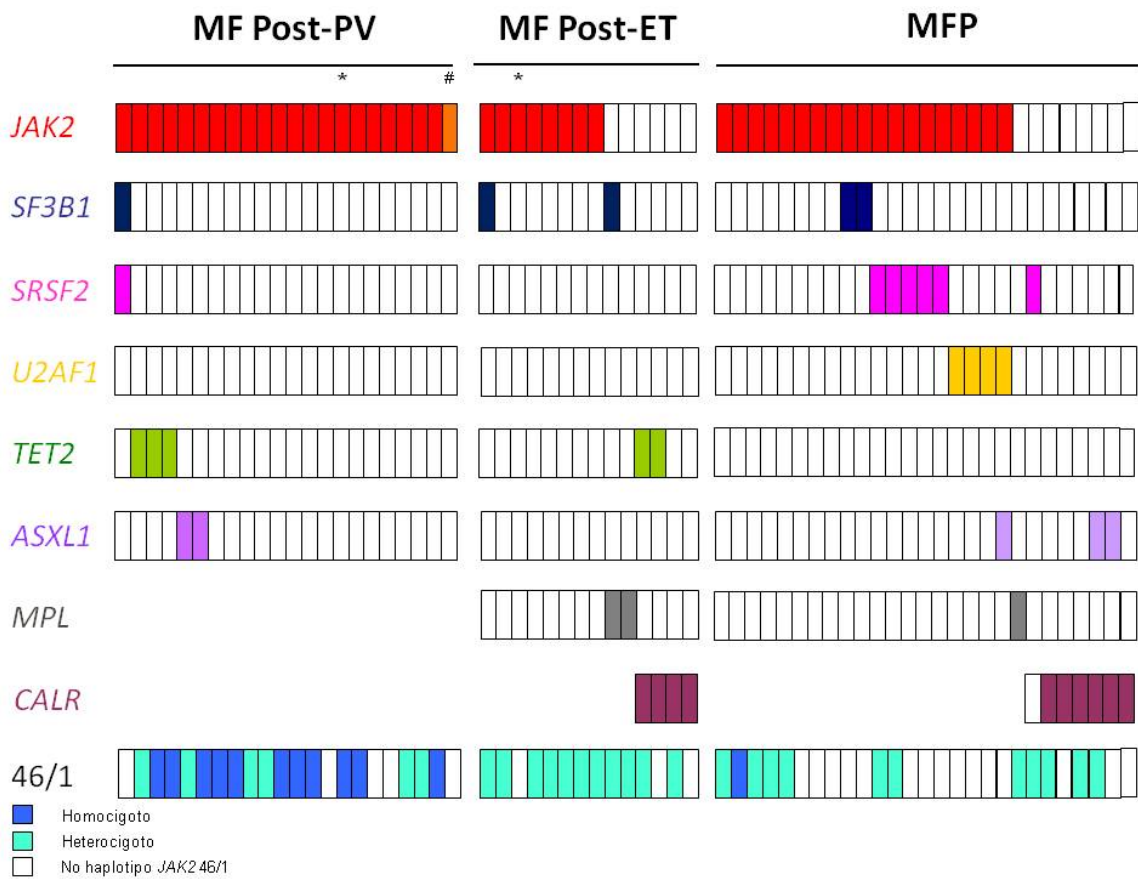
Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Hgb§	Leucocitos§	Plaquetas§	*JAK2	*Otras mutaciones	Haplotipo JAK2 46/1
1	64/H	MFP	135	10,9	360	V617F	-	Heterocigoto
2	65/H	MFP	163	15,2	582	V617F	-	Homocigoto
3	48/H	MFP	106	5,4	289	V617F	-	Heterocigoto
4	77/H	MFP	92	9,5	221	V617F	-	Heterocigoto
5	53/M	MFP	102	3,8	450	V617F	-	Heterocigoto
6	70/M	MFP	62	7,4	78	V617F	-	No
7	66/M	MFP	10	5,6	117	V617F	-	No
8	78/M	MFP	138	17	234	V617F	-	No
9	79/H	MFP	126	12	802	V617F	<i>SF3B1</i> (p.K666N)	No
10	73/M	MFP	140	21	278	V617F	<i>SF3B1</i> (p.K666N)	No
11	54/H	MFP	10.4	11,8	90	V617F	<i>SRSF2</i> (p.P95R)	Heterocigoto
12	79/M	MFP	131	18,1	257	V617F	<i>SRSF2</i> (p.P95H)	Heterocigoto
13	78/H	MFP	84	4,4	89	V617F	<i>SRSF2</i> (p.P95H)	No
14	74/M	MFP	91	40	511	V617F	<i>SRSF2</i> (p.P95H)	No
15	82/H	MFP	146	10	528	V617F	<i>SRSF2</i> (p.P95_R103delinsR)	No
16	77/H	MFP	110	23,3	309	V617F	<i>U2AF1</i> (p.Q157R)	No

Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Hgb§	Leucocitos§	Plaquetas§	*JAK2	*Otras mutaciones	Haplotipo JAK2 46/1
17	71/M	MFP	82	6,8	81	V617F	<i>U2AF1</i> (p.Q157P)	No
18	60/H	MFP	61	13,7	224	V617F	<i>U2AF1</i> (p.Q157R)	No
19	72/H	MFP	74	3,6	59	V617F	<i>U2AF1</i> (p.Q157P), <i>ASXL1</i> (p.R634fs)	No
20	70/H	MFP	116	12,6	958	No Mutado	<i>MPL</i> (p.W515K)	Heterocigoto
21	54/M	MFP	120	8,1	234	No Mutado	<i>SRSF2</i> (p.P95R)	Heterocigoto
22	53/M	MFP	111	10,46	71	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo I)	Heterocigoto
23	55/M	MFP	128	8,5	192	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo II)	No
24	73/M	MFP	118	11,7	102	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo II)	Heterocigoto
25	81/H	MFP	101	5,9	506	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo I), <i>ASXL1</i> (p.N893fs)	Heterocigoto
26	72/H	MFP	12	11,2	370	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo I), <i>ASXL1</i> (p.G643fs)	No
27	36/H	MFP	140	11	502	No Mutado	<i>CALR</i> (tipo I)	No

MFP: Mielofibrosis Primaria; H: Hombre; M: Mujer; §Valores hematológicos al diagnóstico. Hgb: Hemoglobina (g/L), Leucocitos ($\times 10^9/L$), Plaquetas ($\times 10^9/L$); * En todos los pacientes se analizó la presencia de mutaciones en: *JAK2* (V617F), *MPL* (exón 10), *TET2* (secuencia codificante), *ASXL1* (exón 12), *SRSF2* (exón 1), *SF3B1* (exones 14-15), *U2AF1* (exones 2,6-7), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 y R172)

3.3.3.4 Distribución de las mutaciones en MFP y MF post-PV y MF post-TE

Se analizaron los genes *JAK2* (p.V617F y exón 12 en los pacientes con PV), *MPL* (exón 10), *TET2* (secuencia codificante completa), *ASXL1* (exón 12), *SRSF2* (exón 1), *SF3B1* (exones 14-15), *U2AF1* (exones 2, 6 y 7), *IDH1* (p.R132) e *IDH2* (p.R140 y p.R172). En los pacientes con MF post-TE y MF post-PV también se analizaron las mutaciones en *TP53* (exones 2-11) y *c-CBL* (exones 8-9). *Paciente con una mutación en *TP53*. # Paciente con una mutación en el exón 12 de *JAK2*. Haplotipo 46/1 de *JAK2*: homocigoto (azul oscuro), heterocigoto (azul claro), no haplotipo 46/1 (blanco).



DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

El descubrimiento de la mutación JAK2V617F en el año 2005 supuso un avance muy importante en el conocimiento de la patogenia de las NM. Como ya se ha mencionado, la mutación p.V617F del gen *JAK2* se detecta en un 95% de las PV y en un 60% de las TE y MFP. Posteriormente, se describieron alteraciones en el exón 12 de *JAK2* en un 3% de las PV JAK2V617F negativas.

Aunque la mutación JAK2V617F se detecta en un porcentaje elevado de NM, existen evidencias que muestran que dicha mutación no es la única responsable de todos los efectos fisiopatológicos que pueden desarrollar una NM.

En primer lugar, el hecho de que no todos los pacientes con PV, TE o MFP presenten la mutación, indica que deben haber otras alteraciones responsables del desarrollo de una NM. Además, algún estudio como el de Levine y *col.*¹²¹ demostró que un 22% de las TE *JAK2* negativas presentan una hematopoyesis clonal analizada mediante análisis de polimorfismos en el gen *HUMARA* y que un 23% de las TE y un 3% de las PV JAK2V617F positivas presentan una carga alélica de JAK2V617F del 2-25%, pero un porcentaje de clona mieloide, determinada mediante PICX o mediante el análisis de alteraciones citogenéticas, superior. Estos resultados y otros relacionados¹²², sugieren que la TE es una enfermedad heterogénea en la que existen varios mecanismos moleculares implicados en su patogenia, y que, incluso en las NM con mutaciones en *JAK2*, deben existir otras alteraciones que desencadenen una hematopoyesis clonal dando lugar a una NM y que la adquisición de la mutación JAK2V617F, en los casos *JAK2* positivos, es un evento tardío, lo que explicaría que la mutación no se encuentre en todas las células neoplásicas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en estudios de NM familiares, apoyan la hipótesis de que existen otros factores implicados en el desarrollo de una NM. En el estudio de Bellanné-Chantelot y *col.*, se identificaron tres subgrupos de familias acorde al resultado de la mutación de *JAK2V617F*. Por un lado, existía un grupo de NM familiares donde todos los miembros afectados tenían la mutación de *JAK2*, pero al analizar la mutación en células T, B, y NK no detectaron la mutación en estos subtipos celulares en varios de los miembros afectados, indicando que la mutación no está presente en línea germinal, sino que es una mutación somática de la misma manera que en los casos de NM esporádicos. Por otro lado, había familias con varios miembros afectados de NM pero la presencia de la mutación era heterogénea entre los distintos miembros. Finalmente, en un tercer grupo de familias con NM ninguno de los miembros eran portadores de la

mutación apoyando, todos estos resultados, la existencia de otras alteraciones responsables en el desarrollo de la NM ²⁸³.

Finalmente, el hecho de que las LAM secundarias a una NM *JAK2V617F* positiva sean, en un porcentaje elevado, *JAK2* negativas, sugiere la existencia de un modelo en el que una célula madre hematopoyética sea portadora de una alteración molecular pre-*JAK2* (germinal o adquirida) y que alteraciones adicionales, como la mutación de *JAK2*, fueran las responsables de determinar el fenotipo de la NM mientras que la alteración pre-*JAK2* o la adquisición de otras alteraciones adicionales, son las responsables de la progresión a LAM a partir de una clona *JAK2* negativa ²⁷⁶.

En los últimos años, la aplicación de nuevas tecnologías ha permitido la identificación de alteraciones citogenéticas, moleculares o epigenéticas que pueden estar implicadas en la patogenia de las neoplasias mieloides. En ese sentido, técnicas basadas en *arrays* ha llevado al descubrimiento de lesiones cromosómicas, incluyendo micro-deleciones, duplicaciones o disomías uniparentales somáticas (UPD) asociadas a neoplasias mieloides. También se han descubierto nuevas mutaciones somáticas mediante delineación de regiones cromosómicas mínimas afectadas ó técnicas de secuenciación masiva. La aplicación de otras tecnologías también ha llevado a una mejor apreciación de cambios epigenéticos en el genoma de las células leucémicas, incluyendo la metilación de citocinas, hidroximetilación y carboxilación ²²².

Concretamente, la identificación de nuevos marcadores moleculares en las NM ha aportado más conocimiento sobre su biología. Algunos de los nuevos marcadores identificados son de gran utilidad diagnóstica, otros tienen valor pronóstico y, alguno de ellos, podrían ser potenciales dianas terapéuticas. Recientemente, la aplicación de técnicas de secuenciación masiva, para la secuenciación del exoma completo, ha permitido identificar mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina (*CALR*) que se encuentra mutado en hasta un 80% de las TE y las MFP *JAK2* y *MPL* negativas, convirtiéndose en el segundo marcador molecular más frecuente en estas dos patologías. El uso de estas nuevas tecnologías ha permitido identificar múltiples genes que pueden estar alterados en distintas neoplasias mieloides e incluso, en algunos casos, en neoplasias linfoides u otro tipo de neoplasia. Aun así, estos otros marcadores son más inespecíficos detectándose en varias entidades, incluyendo las NM clásicas, aunque en un porcentaje minoritario. En muchos casos, estas alteraciones coexisten con la mutación *JAK2V617F* o las mutaciones en *CALR*, lo que sugiere que más que tener un

papel iniciador de la enfermedad, tienen funciones complementarias en la patogenia de estas enfermedades, pudiendo contribuir, en parte, en la progresión de la misma.

4.1. Incidencia de los nuevos marcadores moleculares en neoplasias mieloproliferativas

Entre los nuevos genes en los que se han descrito alteraciones en pacientes con NM, se encuentran los genes analizados en el presente trabajo que incluyen: *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL*.

El objetivo del primer estudio fue analizar la presencia de alteraciones en los genes *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* en una cohorte de pacientes con NM que carecían de un marcador de clonalidad conocido. De una cohorte total de 241 pacientes diagnosticados de alguna NM Ph negativa clásica se seleccionaron 62 pacientes (5 PV, 5 MFP, 52 TE) en los que no se había detectado la mutación *JAK2V617F*. En los pacientes con PV, también se excluyó la presencia de mutaciones en el exón 12 de *JAK2*, y en el caso de las TE y las MFP se excluyeron aquellos pacientes con mutaciones en el exón 10 del gen *MPL* (S505; W515).

De los 62 pacientes analizados, 3 de ellos presentaban mutaciones en el gen *TET2* (4,8%) una frecuencia similar a la observada en otros estudios en los que se reportan frecuencias de entre 2,5-8,5% en cohortes de NM *JAK2* negativas^{187,189,196}. Los tres pacientes que presentaban mutaciones en *TET2* eran pacientes diagnosticados de TE, representando una frecuencia del 5,8% de mutaciones de *TET2* en la TE, una incidencia también similar a la descrita en la literatura (~ 5%)^{187,196,284}. La información sobre la frecuencia de mutaciones en *TET2* en pacientes con MFP o PV *JAK2* negativas es limitada, aunque la frecuencia global descrita hasta el momento es mayor tanto en la PV (9-16%) como en la MFP (7-17%) respecto a la TE^{187,196}. El hecho de no haber detectado alteraciones en *TET2* en ninguno de nuestros pacientes con MFP o PV podría deberse al bajo número de pacientes analizados (n=10).

En cuanto al gen *ASXL1*, se han descrito mutaciones que afectan, principalmente, al exón 12 del gen, en distintas neoplasias mieloides: un 11% de SMD, un 43% LMMC y un 8% de NM^{66,208,209,284}. En este estudio, tres de los pacientes analizados presentaron mutaciones en *ASXL1* (4,8%), un porcentaje algo inferior al descrito en la literatura. Cabe destacar que un paciente con TE presentaba, simultáneamente, una alteración en *TET2*

y otra en *ASXL1*. La coexistencia de alteraciones en estos dos genes ya se ha descrito con anterioridad, así como la coexistencia con un amplio número de genes implicados en NM²⁰⁸.

Para comparar la incidencia de mutaciones en estos dos genes en pacientes con TE, dependiendo de la presencia o ausencia de la mutación p.V617F de JAK2, se analizaron, adicionalmente, un grupo de 50 pacientes con TE JAK2V617F positivos. Aunque otros estudios reportan frecuencias de mutaciones en *TET2* en un 11-17% de las NM JAK2V617F positivas^{187,189,196}, sin especificar las frecuencias entre las distintas entidades, en la cohorte de TE JAK2V617F positivas de este trabajo, no se detectaron alteraciones en *TET2* o en *ASXL1* en ninguno de los pacientes analizados, indicando que en esta serie de pacientes con TE, las alteraciones en estos nuevos marcadores se detectan con menor frecuencia en los casos JAK2V617F positivos respecto a los casos JAK2V617F negativos. Uno de los puntos que puede influir en la obtención de estos resultados, es que la cohorte de TE JAK2V617F positiva era un grupo de pacientes de reciente diagnóstico, con lo que puede que la enfermedad llevara poco tiempo de evolución y todavía no hubiera adquirido mutaciones adicionales a JAK2V617F, o bien, que sí fueran portadores de alguna pequeña clona con alguna otra mutación, pero todavía no se hubiera expandido lo suficiente como para poder ser detectada por técnicas con una sensibilidad más limitada, como la secuenciación Sanger.

Cabe destacar que, en el presente estudio, el análisis de los genes se centró en el *screening* de mutaciones sin considerar otras alteraciones que también podrían alterar la función de estos genes, como por ejemplo, deleciones cromosómicas que afecten a la región cromosómica 4q (donde se localiza el locus de *TET2*) o bien a la región cromosómica 20q11 (donde se localiza el locus de *ASXL1*)^{189,190,260}. Por este motivo, aunque las alteraciones estructurales sean menos frecuentes, no se puede descartar que haya una mayor frecuencia de alteraciones de estos genes en el grupo de pacientes analizados.

Todas estas mutaciones afectan, en teoría, a una célula madre hematopoyética. Para determinar en qué momento de la hematopoyesis se adquieren estas alteraciones, en función de los tipos celulares afectados, se analizó la presencia de las alteraciones patogénicas detectadas en *TET2* y *ASXL1*, en el ADN extraído de las células mononucleadas (linfocitos T y B, mayoritariamente) de los pacientes portadores de dichas mutaciones. Las alteraciones en *TET2* no se detectaron en estas subpoblaciones celulares, sugiriendo que las mutaciones se adquieren en un progenitor mielóide por lo

que las células portadoras de la mutación sólo pertenecen al linaje mieloide. Por el contrario, las alteraciones en *ASXL1* sí se detectaron en ADN de células mononucleadas, sugiriendo que las alteraciones en *ASXL1* afectan a un progenitor hematopoyético más temprano, común a la estirpe mieloide y linfoide, o bien que se trata de alteraciones presentes en línea germinal, como también se ha descrito en algunos casos con mutaciones en *TET2*¹⁹⁸. Dado que no disponíamos de otro tipo de ADN control de estos pacientes, como por ejemplo ADN extraído de saliva o folículo piloso, no se pudo excluir esta última posibilidad. Estos resultados irían acorde a los resultados del estudio de Carbuccia *y col.*, donde reportaban que las mutaciones en *ASXL1* se detectaban en células CD34+ y sugerían que las mutaciones en este gen podrían adquirirse en un estadio temprano de la hematopoyesis durante el desarrollo y evolución de la enfermedad²⁰⁸.

Ninguno de los pacientes analizados presentó mutaciones bialélicas en *TET2* o *ASXL1*, indicando que la haploinsuficiencia, es decir, la alteración de un único alelo del gen, es suficiente para tener un papel en el desarrollo de la enfermedad y no es necesario perder la funcionalidad de ambos alelos. Esta característica también se ha observado en otras series en las que aproximadamente el 50% de los pacientes presentaban alteraciones monoalélicas en *TET2*.

Existen varios estudios que asocian la presencia del haplotipo 46/1 del locus *JAK2* con una mayor tendencia a adquirir mutaciones en el mismo gen (p.V617F y mutaciones en el exón 12) así como en otros genes como *MPL*²⁸⁵. En todos los pacientes se analizó la presencia del haplotipo 46/1 del locus de *JAK2* mediante el análisis de dos polimorfismos: rs12340895 y rs12343867. Los resultados de ambos polimorfismos eran totalmente concordantes y mostraron que 29 de los pacientes no presentaban el haplotipo 46/1 mientras que 33 de ellos sí lo presentaban (29 pacientes en heterocigosis y 4 pacientes en homocigosis). No se pudo establecer ninguna asociación entre la presencia de mutaciones en *TET2* o *ASXL1* y la presencia del haplotipo 46/1, aunque hay que considerar el bajo número de mutaciones detectadas. De forma similar, otros estudios tampoco han demostrado diferencias significativas en la frecuencia de mutaciones de *TET2* entre los pacientes con o sin el haplotipo 46/1 de *JAK2*¹⁸⁷.

Finalmente, realizamos el estudio mutacional de los genes *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL*, en los que, principalmente, se han detectado mutaciones en leucemias agudas mieloides (*de novo* o secundarias) y en MFP. No se detectaron mutaciones en ninguno de los pacientes analizados. Estos resultados, junto los previamente publicados, sugieren que

las alteraciones en *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* no parecen tener un papel en la fase crónica de una NM aunque sí podrían ser relevantes en el proceso de transformación de la misma, especialmente en la progresión a LAM^{205,286-290}.

Desde el punto de vista diagnóstico, considerando el descubrimiento de las mutaciones en *CALR*, que se detectan en un 50-80% de las TE *JAK2* y *MPL* negativas, la incorporación del estudio mutacional de *TET2* o *ASXL1* como marcadores diagnósticos no sería de utilidad, teniendo en cuenta que cada uno se detecta con frecuencias inferiores al 10% en la TE *JAK2* negativa, y en un porcentaje aún inferior si se excluyen los casos *CALR* positivos. Al tratarse de genes extensos, su incorporación en la rutina diagnóstica sería complicada ya que se trata de un análisis laborioso y caro para la baja incidencia de casos en los que un resultado positivo sería de utilidad.

4.2. Significado clínico de la detección de una hematopoyesis clonal en la TE *JAK2* negativa

El segundo estudio presentado se basó en el estudio de la importancia clínica que podía tener la detección de una hematopoyesis clonal, mediante el estudio del patrón de inactivación del gen *HUMARA* y de la detección de mutaciones, partiendo de la premisa (antes de finales del año 2013), de que el 60% de los pacientes con TE presentaban la mutación *JAK2V617F*, pero que aun así quedaba un elevado porcentaje de pacientes sin este marcador de clonalidad. El conocimiento sobre si existen diferencias en el curso clínico de los pacientes con TE que presentan o no una hematopoyesis clonal es limitado. Por ese motivo, el objetivo del segundo trabajo fue evaluar la relevancia clínica que tenía la detección de una hematopoyesis clonal en la TE en relación a diversos parámetros clínicos como la respuesta al tratamiento, la probabilidad de trombosis, hemorragia, transformación y supervivencia. En este estudio se incluyeron un total de 73 pacientes que integraban los 52 pacientes con TE analizados en el primer trabajo, junto con 21 nuevos pacientes diagnosticados de TE *JAK2V617F* negativa. La determinación de una hematopoyesis clonal se consideró, inicialmente, en base a la detección de clonalidad mediante el análisis del polimorfismo del gen *HUMARA* (en el caso de las mujeres), así como la detección de alguna mutación en los genes *MPL*, *TET2* o *ASXL1*.

Aunque los datos no fueran estadísticamente significativos, ninguno de los pacientes, en los que se detectaron mutaciones en los genes analizados, presentó algún evento trombótico a lo largo de la enfermedad, mientras que en los diez pacientes que

presentaron trombosis no se detectaron mutaciones en *MPL*, *TET2* o *ASXL1*, resultando en una probabilidad de trombosis a los 10 años del 22% en pacientes sin mutaciones *versus* el 0% en pacientes con mutaciones en los genes analizados. Los resultados obtenidos en cuanto la asociación de la detección de una hematopoyesis clonal y el riesgo trombótico son contrarios a los reportados en algunos estudios previos en los que se asociaba la detección de clonalidad mieloide, mediante técnicas que analizaban el PICX en mujeres con TE, con un mayor riesgo de padecer algún episodio trombótico, aunque no se asociaba a un mayor riesgo de padecer eventos hemorrágicos²⁹¹. En esta misma línea, el estudio de Harrison *y col.*, objetivó que las mujeres que presentaban un patrón de hematopoyesis policlonal tenían un menor riesgo de presentar complicaciones trombóticas respecto a aquellas que presentaban un patrón clonal⁸¹. En el segundo trabajo presentado, el hecho de no haber detectado asociación entre presentar una hematopoyesis clonal y el riesgo trombótico debe interpretarse con cautela ya que la trombosis es un proceso multifactorial en el que aparte de la propia patología de la TE pueden influir múltiples mecanismos como la edad, los factores de riesgo cardiovasculares, la historia de trombosis o el tipo de tratamiento administrado. Además, el poder estadístico del estudio es limitado debido al pequeño tamaño de la serie estudiada y el bajo número de eventos trombóticos registrados, de manera que se requieren estudios adicionales para confirmar estos resultados.

Finalmente, del total de pacientes analizados, 6 de ellos desarrollaron transformación de la enfermedad: 5 pacientes evolucionaron a mielofibrosis y un paciente desarrolló síndrome mielodisplásico. Las 5 pacientes que evolucionaron a mielofibrosis eran mujeres y todas ellas presentaban una hematopoyesis clonal mediante análisis del gen *HUMARA*. Asimismo, 4 de las 5 pacientes también presentaban mutaciones en alguno de los genes analizados (*MPL*, *TET2* o *ASXL1*). El paciente que evolucionó a SMD era portador de una mutación en *TET2* y *ASXL1* simultáneamente, indicando que, todos los casos transformados presentaban una hematopoyesis clonal demostrada, ya fuera por los estudios del PICX mediante el análisis del gen *HUMARA*, como por presentar mutaciones en alguno de los genes analizados. Por el contrario, ninguno de los pacientes transformados presentaba una hematopoyesis policlonal.

Los resultados mostraron que la probabilidad de transformación a los 10 años era mayor en las mujeres con un resultado del ensayo del gen *HUMARA* clonal (35% en casos clonales vs 0% en casos policlonales, $p=0,004$) y que los pacientes con mutaciones también tienen una mayor probabilidad de transformación de la enfermedad (2% sin

mutaciones versus 64% con mutaciones, $p=0,001$), siendo éste el hallazgo más relevante del estudio inicial.

Todo este trabajo fue previo a las publicaciones sobre la descripción de las mutaciones en el gen *CALR* a finales del año 2013, y que se ha convertido en el segundo marcador de clonalidad más frecuente en la TE. Por este motivo, tras su descripción, se analizó la presencia de mutaciones en 66 de los 73 pacientes de los que se disponía de ADN restante, con la intención de confirmar los principales hallazgos observados en el análisis inicial.

Los resultados mostraron que un 50% de los pacientes analizados de esta cohorte presentaban mutaciones en el gen *CALR*, un 9 % presentaba mutaciones en *MPL* y un 48% de los pacientes no presentaban mutaciones en *JAK2*, *CALR* ni *MPL*, considerándose triple negativos.

El nuevo análisis estadístico se realizó incorporando al grupo de pacientes con alguna mutación en los genes considerados inicialmente (*MPL*, *TET2*, *ASXL1*), el resultado del estado mutacional del gen *CALR*. De forma similar a los resultados iniciales, no se observó que existiera asociación entre la presencia de mutaciones y el riesgo de padecer eventos trombóticos ($p=0,86$) o hemorrágicos ($p=0,44$). En relación al principal resultado observado en el segundo trabajo, no se confirmó la significación estadística entre la detección de mutaciones y el riesgo de transformación, aunque sí se observó una tendencia importante en la que aquellos pacientes con mutaciones parecían presentar un mayor riesgo de transformación de la enfermedad a mielofibrosis o mielodisplasia, respecto a los pacientes en los que no se detectaron mutaciones en los genes analizados. También se pudo observar, que el tipo de mutación que presentaban los pacientes tenía importancia respecto al riesgo de transformación. Concretamente, se observó que los pacientes con mutaciones en *MPL* o *CALR* tipo 1, *TET2* o *ASXL1* tenían mayor riesgo de transformación respecto a los pacientes que presentaban otro tipo de mutación en *CALR* o que no presentaban ninguna mutación en los genes analizados, y esta asociación era estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En este estudio, todos los pacientes *CALR* positivos que evolucionaron a MF eran pacientes con la mutación tipo 1 (delección de 52pb), lo cual sugiere que esta mutación puede tener consecuencias biológicas más importantes que favorezcan el avance y la transformación de la enfermedad. En otros estudios como el de Andrikovics y *col.*, no detectan diferencias demográficas ni características clínicas entre los paciente con TE con mutaciones en *CALR* tipo I o tipo II, a excepción de que lo pacientes con mutaciones de *CALR* tipo II

son mayores, presentan niveles de plaquetas más elevados y requieren más tratamiento citorreductor que los pacientes con la mutación de tipo I ó sin la mutación de tipo II ²⁹². Se precisaría de más series para poder determinar si existe una distinta capacidad patogénica entre las diferentes mutaciones de *CALR*. También se ha observado una asociación entre la presencia de mutaciones en *MPL* y el riesgo de transformación mielofibrótica, un dato que está publicado en el trabajo de Álvarez-Larrán y *col.*, en el que observan que la presencia de características histológicas, mutaciones en *MPL* y niveles elevados de LDH en suero, se asocian a una mayor probabilidad de transformación mielofibrótica en pacientes con TE ²⁴⁵. Aun así, se requieren de más estudios para poder confirmar si la presencia de determinadas mutaciones puede ser de especial relevancia en la transformación de una TE a mielofibrosis.

4.3. Alteraciones moleculares en la transformación mielofibrótica de la PV y la TE JAK2V617F positiva y negativa

La transformación de una NM a LAM forma parte de la evolución natural de la enfermedad ocurriendo en un 2-5% de los pacientes con TE o PV y en un 15-30% de los pacientes con MF. De forma similar, entre un 4-8% y un 10% de los pacientes con TE y PV, respectivamente, evolucionan a mielofibrosis a los 10 años desde el momento del diagnóstico, pero se desconoce las causas por las que algunos pacientes se transforman y otros no.

Los factores pronósticos de la MF post-PV no están bien establecidos. La duración de la enfermedad, la historia de tratamiento citorreductor, la presencia de leucocitosis y la carga alélica de *JAK2* se han propuesto como factores de riesgo de transformación mielofibrótica ^{25,62,293-298}.

Más en concreto, en relación a la carga mutacional de *JAK2*, varios estudios han asociado una carga alélica elevada de la mutación JAK2V617F (carga alélica superior al 50%), o un patrón de la carga variante, ya sea un aumento progresivo de la carga alélica como un descenso no explicable (descenso no debido al tratamiento), con un mayor riesgo a padecer eventos vasculares y transformación mielofibrótica en pacientes con PV ^{298,299}. Esta observación iría acorde con el hecho de que la detección de una carga mutacional elevada en los granulocitos, se ha asociado a dominancia clonal de los progenitores hematopoyéticos JAK2V617F positivos, una característica asociada a

algunos pacientes con PV (en un 50% de los casos) pero sobre todo a pacientes con mielofibrosis primaria o mielofibrosis secundaria ^{115,120,258,300}.

Moliterno y *col.* define de forma arbitraria el concepto de dominancia clonal, a nivel de progenitores hematopoyéticos, como una diferencia absoluta entre la cantidad de carga alélica de la mutación de *JAK2* entre los neutrófilos y las células CD34+ de $\leq 10\%$, es decir, cuando existe coherencia entre la carga mutacional de *JAK2V617F* en los progenitores CD34 positivos y los granulocitos. La dominancia clonal se puede observar en los pacientes con MFP desde el momento del diagnóstico y en algunos casos de PV en fases avanzadas de la enfermedad ²⁵⁸. También se ha reportado que la dominancia clonal es una característica de la MF post-PV y post-TE, donde se suele observar un aumento de la carga mutacional en las fases avanzadas de la enfermedad y en la transformación mielofibrótica, sugiriendo que, biológicamente, esta fase mielofibrótica se asemeja más a la MFP donde existe a nivel de la célula madre hematopoyética, una dominancia de la clona neoplásica respecto al resto de progenitores no mutados ^{120,259,260}. Algunos de los parámetros clínico-biológicos a los que se ha asociado la detección de dominancia clonal son niveles de leucocitos elevados, niveles más bajos de hemoglobina y presencia de esplenomegalia, con independencia de variables como el tipo de enfermedad o el tratamiento, lo que parece contribuir al desarrollo de un fenotipo clínico en el que está potenciada la mieloproliferación ²⁶⁰.

En el caso de la TE, antes de la descripción de la mutación p.V617F del gen *JAK2*, la aparición de precursores mieloides inmaduros en sangre periférica, una disminución de los niveles de Hgb no relacionados con el tratamiento y un aumento de los niveles de LDH en sangre, seguidos de una disminución progresiva de plaquetas, aumento de leucocitosis y esplenomegalia progresiva, eran las principales características clínicas que se observaban en los pacientes con TE que evolucionaban a MF secundaria ⁴⁴. Tras la descripción de la mutación de *JAK2*, se observó que la carga mutacional en la TE suele ser inferior al 50%, pero que una carga alélica elevada se asocia a un curso clínico más agresivo así como a un mayor riesgo de transformación mielofibrótica ²⁹⁷⁻²⁹⁹.

No se ha observado que la mutación *JAK2V617F* confiera ventaja proliferativa a los progenitores hematopoyéticos, sino que más bien tiene una influencia importante en la diferenciación hacia la línea mieloide ³⁰¹. Se postula que la presencia de mutaciones adicionales puede tener un papel en la transformación de la enfermedad a mielofibrosis o a leucemia aguda, tal vez promoviendo el desarrollo de dominancia clonal a nivel de progenitores hematopoyéticos, confiriendo ventaja proliferativa a la clona patológica

respecto a las células sin la mutación. Algunos de los genes que se han asociado a progresión de la enfermedad son: *TET2*, *DNTM3A*, *ASXL1*, *EZH2*, *TP53*, *CBL*, *SH2B3* e *IDH1*, entre otros^{208,302,303}.

Un estudio reciente analizó, mediante NGS, un panel de 104 genes con posible asociación con las neoplasias mieloides, en 197 pacientes con NM. Los resultados mostraron que, en global, un 44%, un 29% y un 35% de las PV, TE y MFP, respectivamente, presentaban alguna mutación somática en alguno de los genes estudiados, a parte de la mutación JAK2V617F y mutaciones en *CALR*. Además, observaron que la presencia de dos o más mutaciones somáticas reducía significativamente la supervivencia global y aumentaba el riesgo a leucemia aguda²³⁸, lo que sugeriría que la presencia de múltiples alteraciones podría tener un papel pronóstico en las NM, y que la mayoría de estas mutaciones ya estaban presentes en el momento del diagnóstico aunque fuera con una baja carga tumoral.

En un tercer trabajo, se caracterizó a nivel molecular una serie de 36 pacientes diagnosticados de TE (14 casos) o PV (22 casos) que evolucionaron a mielofibrosis durante el curso de la enfermedad.

Una parte del estudio se centró en el estudio de los genes *SRSF2*, *SF3B1* y *U2AF1*, que recientemente se han descrito implicados en neoplasias mieloides y que forman parte de la maquinaria del *splicing* del ARN mensajero.

Los resultados obtenidos mostraron una frecuencia de mutaciones del 3% y del 8% en los genes *SRSF2* y *SF3B1* respectivamente. De los tres pacientes con mutaciones en *SF3B1*, dos de ellos eran MF post-TE, mientras que el tercer paciente era una MF post-PV que presentaba, simultáneamente, una mutación en *SF3B1* y otra en *SRSF2*. Aunque la coexistencia de mutaciones en genes del *splicing* es algo infrecuente sí se han reportado, algunos pacientes con SMD que presentan coexistencia de alteraciones en este grupo de genes²³⁰. Finalmente, en relación al gen *U2AF1*, no se detectaron mutaciones en ninguno de los pacientes analizados.

Para poder establecer si existe diferencia en la incidencia de mutaciones en estos genes entre los pacientes con mielofibrosis post-TE o post-PV y los pacientes con PV o TE en fase crónica, se analizó de forma adicional, un grupo de 30 pacientes con PV y un grupo de 30 pacientes con TE en fase estable de la enfermedad. En estos grupos de pacientes, sólo se detectaron dos mutaciones en *SRSF2* en un mismo paciente con TE. Por el contrario, en ninguno de ellos se identificaron mutaciones en *SF3B1* o *U2AF1*.

Algunos estudios han reportado la presencia de alteraciones en *SF3B1* en pacientes con TE o MF post-TE, pero ninguno ha descrito mutaciones en pacientes con PV o MF post-PV^{224,304}. Estos estudios, junto con los resultados obtenidos en este trabajo indican que la incidencia de mutaciones en genes del *splicing* en la PV o la TE en fase crónica es muy baja.

De forma análoga, para determinar si la incidencia de mutaciones en fase mielofibrótica de una PV o TE era comparable a la incidencia de mutaciones en MFP, también se analizó una serie de 27 pacientes diagnosticados de MFP. En este grupo de pacientes, se detectaron mutaciones en *SRSF2* en un 22%, en *SF3B1* en un 7% y en *U2AF1* en un 15% de los casos analizados. Aunque la cohorte de pacientes es limitada parece que existe una diferencia significativa en cuanto a la incidencia de mutaciones en *SRSF2* y *U2AF1* entre los pacientes con MFP y los pacientes con mielofibrosis secundaria. Por el contrario, no parece existir diferencias entre ambos grupos respecto a las mutaciones en *SF3B1*, en concordancia con lo reportado previamente en otras series²²⁶. Estos hallazgos sugieren que el perfil de mutaciones en los genes de la maquinaria del *splicing* es diferente entre los pacientes con MFP y los pacientes con MF secundaria a una TE o PV³⁰⁵.

Se ha descrito una mayor incidencia de mutaciones en *ASXL1*, *TET2*, *IDH1* y *IDH2* en las LAM secundarias a una NM, aunque se desconoce cuál es el orden de adquisición y el mecanismo por el cual estas alteraciones pueden favorecer la transformación leucémica de una NM en fase crónica. En ese sentido, también se analizó el estado mutacional de este grupo de genes, en el grupo de pacientes con NM que evolucionó a MF, con la finalidad de estudiar si estos genes podrían tener un papel, no sólo en la transformación a LAM, sino también en la transformación mielofibrótica de la TE o la PV.

La incidencia de alteraciones en *TET2* fue mayor en el grupo de las MF secundarias que en el grupo de las TE en fase crónica (trabajo I), detectándose mutaciones en un 14% de los casos. Aun así, este porcentaje sigue siendo inferior al detectado en otras series. En cuanto al gen *ASXL1*, hay varios estudios en los que se reportan frecuencias del 23 al 50% de mutaciones en pacientes con mielofibrosis secundaria^{208,260,306,307}. En el presente estudio, tan sólo se detectaron mutaciones en un 9% de los pacientes con MF post-PV. Una de las posibles explicaciones para justificar esta diferencia de frecuencias podría ser el número de pacientes analizados, aunque en ese sentido otras series similares presentaban frecuencias de mutaciones del 22% en las MF secundarias³⁰⁶. Otra posible explicación estaría relacionada con la sensibilidad de la técnica empleada aunque, en

este caso, los distintos estudios también utilizaron la técnica de secuenciación Sanger para el análisis mutacional. Finalmente, la interpretación de ciertas mutaciones, especialmente aquellas mutaciones con cambio de aminoácido, podrían variar la incidencia reportada entre los distintos estudios publicados, ya que se podría estar considerando posibles polimorfismos como mutaciones patogénicas, o bien se podrían estar interpretando de distinta forma ciertas variantes controvertidas como la p.Gly646TrpfsX12. Algunos estudios detectan esta alteración en más de un 25% de muestras controles sin enfermedades hematopoyéticas, motivo por el cual la consideran un artefacto en vez de una alteración somática ³⁰⁸. Por otro lado, otros estudios no detectan dicha alteración en células CD3 positivas por lo que la consideran una mutación somática patogénica.

El estudio de Stein y *col.* demostraba que las mutaciones en *ASXL1* se adquieren con el tiempo en pacientes que evolucionan de TE a MF post-TE, asociándose al proceso de transformación y una vez adquirida, no parece extinguirse sino que gana en representación clonal. La presencia de la mutación no parece asociarse a un menor intervalo tiempo hasta el desarrollo de la transformación ²⁶⁰. Algo similar se podría observar en algunos de los pacientes analizados en los tres trabajos presentados, en los que se detectaron mutaciones en *ASXL1* o *TET2* en algún momento de la enfermedad y en los que al analizar la muestra del diagnóstico, no se detectaron dichas mutaciones indicando que, en estos casos, las alteraciones no tuvieron un papel en el desarrollo de la enfermedad sino que se adquirieron posteriormente y hubo una expansión de las clonas mutadas durante la evolución y transformación de la enfermedad.

Finalmente, en relación a los genes *IDH1* e *IDH2*, en los que se han detectado alteraciones en una minoría de los pacientes con TE y PV en fase crónica, pero una mayor frecuencia en LAM *de novo* o secundaria a una NM, no se detectaron mutaciones en ninguno de los pacientes con mielofibrosis secundaria. Al contrario de lo esperado, tampoco se detectaron alteraciones en *IDH1* o *IDH2* en los pacientes con MFP, donde el porcentaje de mutaciones descrito es del 4-6%, algo superior al de la PV o la TE (< 2%) ^{103,181,284,309}. Especialmente se esperaban detectar mutaciones en *IDH1* o *IDH2* en aquellos pacientes en los que se habían detectado mutaciones en el gen *SRSF2*, ya que algunos estudios asocian la presencia de mutaciones en *SRSF2* con coexistencia de mutaciones en *IDH1* o *IDH2* ⁶⁵.

Todos los pacientes con PV o TE que evolucionaron a MF tenían al menos una mutación en los genes analizados. En global, 12 pacientes (33%) presentaban alguna alteración

en otros genes a parte de *JAK2*, *MPL* y *CALR*, como *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *SF3B1* y *SRSF2* indicando que, un porcentaje elevado de pacientes que presentan transformación mielofibrótica, tienen un marcador adicional y que pueden estar presentes tanto en el diagnóstico como se pueden adquirir o expandir durante la evolución de la enfermedad. Este estudio se ha limitado al análisis de ciertos genes, pero es muy probable que existan alteraciones en otros genes, que no se hayan incluido en este trabajo, que podrían estar contribuyendo en la progresión de la PV o la TE, con lo que el porcentaje de pacientes con mutaciones adicionales a *JAK2*, *CALR* o *MPL*, en esta cohorte podría ser superior al observado en el presente estudio.

4.4. Valor pronóstico de los nuevos marcadores

Existen múltiples artículos en los que ha estudiado el valor pronóstico que podrían tener los nuevos biomarcadores en neoplasias mieloides y en algunos casos también en neoplasias linfoides.

Actualmente, los únicos marcadores cuyo valor pronóstico está mejor definido son las mutaciones en *ASXL1*, *SRSF2* y *EZH2* en pacientes con MF ya que se asocian a una supervivencia más corta. Estos genes, junto con *IDH1* e *IDH2*, tendrían un valor negativo, identificando aquellos pacientes con MF que tienen un riesgo prematuro a morir o a transformarse a LAM ⁶⁴.

En cuanto al valor pronóstico de las mutaciones en *TET2*, se han publicado varios artículos en los que se observaban resultados contradictorios y distinta relevancia pronóstica de las alteraciones en *TET2* dependiendo de la patología estudiada. El estudio de Tefferi y *col.* demostró que las mutaciones en *TET2* no afectan a la supervivencia, ni se asocian a transformación leucémica o a mayor riesgo trombótico en pacientes con PV o MF, mostrando una relevancia pronóstica limitada ¹⁹⁶. Por el contrario, otros estudios han reportado que *TET2* es un marcador pronóstico negativo en pacientes con LAM de riesgo intermedio. Abdel-Wahab y *col.* observó que los pacientes con LAM portadores de mutaciones en *TET2* tenían peor supervivencia que los pacientes con LAM sin alteraciones en dicho gen. Asimismo, otros estudios han observado una mayor incidencia de mutaciones en *TET2* en los blastos de pacientes que sufren transformación leucémica ^{187,201}. Recientemente, en la misma línea, el estudio de Lundberg y *col.* reporta que las mutaciones en *TET2* sí parecen asociarse a un peor pronóstico en pacientes con TE, PV o MF ²³⁸.

En otras patologías, como en los SMD, las mutaciones en *TET2* parecen conferir un pronóstico favorable, ya que varios estudios observan que la supervivencia global está significativamente aumentada en pacientes con mutaciones en *TET2* respecto a los pacientes sin mutaciones en este gen¹⁹².

En los trabajos presentados no se ha podido establecer un valor pronóstico claro de ninguno de los nuevos marcadores moleculares. En primer lugar, dada la baja incidencia de mutaciones en *TET2* y *ASXL1* observadas en la cohorte de pacientes con NM *JAK2* y *MPL* negativas no se pudo realizar el análisis para determinar si estas alteraciones podían tener un valor pronóstico o asociarse a alguna característica clínica. Finalmente, en el estudio de NM evolucionadas a MF tampoco se pudo establecer, en ninguno de los grupos de pacientes, una asociación entre la presencia de mutaciones en alguno de los genes analizados con la supervivencia global debido, probablemente, al limitado número de pacientes analizados. Sin embargo, como era esperable, sí se observó una asociación significativa ($p=0,001$) entre la supervivencia global y el IPSS de los pacientes.

Como se ha comentado anteriormente, la frecuencia de mutaciones en *SRSF2* en pacientes con TE o PV es muy baja, por lo que no se conoce si este marcador sigue teniendo valor pronóstico en estas entidades. El estudio de Zhang y col. sí observó una mayor frecuencia de mutaciones en *SRSF2* en los pacientes con NM que evolucionaban a LAM, asociándose a una peor supervivencia global. Aunque en el trabajo no se haya podido demostrar ningún valor pronóstico de estos marcadores, cabe mencionar que, el paciente con MF post-PV portador de dos mutaciones simultáneas en *SF3B1* y *SRSF2*, mostró una progresión muy rápida de la enfermedad falleciendo a los dos años tras el diagnóstico. De forma similar, el paciente con TE en fase crónica, que presentaba doble mutación en *SRSF2*, desarrolló una LAM *JAK2V617F* negativa/*SRSF2* positiva, ocho años después del diagnóstico. Este hecho iría en consonancia con lo descrito en la literatura donde las alteraciones en *SRSF2* se asocian a mal pronóstico y en particular a un mayor riesgo de transformación leucémica. Cabe destacar que en el estudio de Zhang y col. estas mutaciones coexistían, en varios casos, con otras alteraciones adicionales, sugiriendo que a pesar de que las mutaciones en *SRSF2* tengan un valor pronóstico negativo, la presencia de otras alteraciones adicionales, podría ser fundamental para el desarrollo de la transformación leucémica.

4.5. Evolución y adquisición de alteraciones durante la progresión de las NM

En los estudios realizados se ha detectado la presencia de distintas alteraciones en nuevos genes, tanto en pacientes con TE o MF JAK2V617F negativos, así como en pacientes con MF post-PV o MF post-TE JAK2V617F positivos y negativos.

En algunos de estos pacientes se ha podido realizar el estudio en distintos puntos de la evolución de la enfermedad y se han observado distintos patrones de adquisición y expansión de las clonas portadoras de dichas alteraciones (Tabla 18).

Tabla 18: Adquisición y evolución de mutaciones en los pacientes con TE o PV evolucionados a mielofibrosis o mielodisplasia

Paciente	Evolución	Alteraciones al Diagnóstico	Muestra Intermedia	Alteraciones en la Transformación
1	TE-> MF	<i>MPL+</i>		<i>MPL+</i>
2	TE-> MF	ND	<i>MPL+</i> (87%), <i>SF3B1+</i> (50%)	<i>MPL+</i> (87%), <i>SF3B1+</i> (50%)
3	TE-> MF	<i>CALR+</i> , <i>TET2-</i>		<i>CALR+</i> , <i>TET2+</i>
4	TE-> MF	ND	<i>CALR+</i> (45%), <i>TET+</i> (5%)	<i>CALR+</i> (55%), <i>TET2+</i> ,
5	TE-> SMD	<i>TET2-</i> , <i>ASXL1-</i>	<i>TET2+</i> , <i>ASXL1+</i>	<i>TET2+</i> , <i>ASXL1+</i>
6	TE-> MF	<i>JAK2V617F+</i> (8%), <i>SF3B1+</i> (3%)		<i>JAK2V617F+</i> (99%), <i>SF3B1+</i> (45%)
7	PV-> MF	<i>JAK2V617F+</i> (67%), <i>SRSF2+</i> (60%), <i>SF3B1+</i> (49%)		<i>JAK2V617F+</i> (52%), <i>SRSF2+</i> (60%), <i>SF3B1+</i> (48%)
8	PV-> MF	<i>JAK2V617F+</i> (70%), <i>TET2+</i>		<i>JAK2V617F+</i> (80%), <i>TET2+</i>

ND: No determinado ya que no se disponía del material correspondiente al momento del diagnóstico

Los porcentajes mostrados en referencia a las mutaciones de *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2* y *MPL* son los porcentajes correspondientes a las secuencias mutadas obtenidas tras el análisis de estas regiones mediante secuenciación masiva en un sistema GS 454 Junior.

La cuantificación de *JAK2V617F* se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando sondas aleoespecíficas para cada uno de los alelos (mutado y no mutado). El porcentaje de mutación está calculado como el porcentaje del número de copias de *JAK2V617F*/número de copias de *JAK2* total (*V617F* y no mutado)

En primer lugar, las 5 TE *JAK2V617F* negativas que evolucionaron a MF presentaban algún marcador de clonalidad. Una paciente presentaba una mutación compleja de *MPL* (p.W515_P518delinsKT) que se detectó tanto en la fase mielofibrótica como en la muestra correspondiente al diagnóstico (Tabla 18, paciente 1). Desafortunadamente, no disponíamos de ADN del diagnóstico de la segunda paciente portadora de una de las

mutaciones clásicas de *MPL* (p.W515L) coexistiendo con una alteración en *SF3B1*, en la fase de MF post-TE (Tabla 18, paciente 2).

En una de las dos pacientes con TE en las que se detectó una mutación en *TET2* en la fase mielofibrótica, no se pudo detectar la mutación en la muestra del diagnóstico, a pesar de que se realizó un análisis de alta profundidad empleando técnicas de secuenciación masiva en un sistema de GS 454 Junior. Sin embargo, esta paciente, también presentaba un mutación tipo 1 (deleción de 52 nucleótidos) en el gen *CALR*, tanto en la muestra del diagnóstico como en la muestra de la mielofibrosis, sugiriendo que la mutación de *CALR* podría tener un papel más iniciador en el desarrollo de la TE, mientras que la adquisición de la alteración en *TET2* podría tener un papel en la evolución a mielofibrosis (Tabla 18, paciente 3).

De la segunda paciente con MF post-TE, en la que se detectó otra mutación en *TET2* en la fase mielofibrótica mediante secuenciación Sanger, no disponíamos de ADN del momento del diagnóstico, pero sí de una muestra intermedia tres años tras el diagnóstico y en una fase inicial de la mielofibrosis. En este punto, no se pudo detectar la mutación mediante secuenciación Sanger, pero el estudio utilizando otras técnicas como la de *High Resolution Melting* (HRM) sí demostró un perfil similar al de la mutación en fase avanzada de la mielofibrosis pero en una baja carga alélica. El posterior análisis mediante secuenciación masiva, detectó la mutación en un 5% de las secuencias obtenidas, confirmando la presencia de una pequeña clona *TET2* positiva en fases iniciales de la mielofibrosis que se fue expandiendo durante la progresión de la enfermedad. De forma similar al caso anterior, esta paciente también presentaba una mutación en el gen *CALR*, aunque dicha mutación se detectó en un porcentaje similar tanto en la fase inicial de la mielofibrosis (45%) como en fases más avanzadas de la misma (55%) (Tabla 18, paciente 4).

Por otro lado, el paciente con TE que presentaba, simultáneamente, alteraciones en *TET2* y *ASXL1*, evolucionó a mielodisplasia a los 9 años tras el diagnóstico (Tabla 18, paciente 5). Este paciente había sido tratado con ³²P, BU y HU. Cómo el tratamiento pudo contribuir a la transformación de la enfermedad es un tema controvertido. Aunque algunos estudios como el de Van de Pette y col. detecta una frecuencia de transformación de TE a MF en un 24% de los casos tratados con BU, apoyando que existe una influencia de los agentes citolíticos en el desarrollo de la MF secundaria, en otros estudios como el de Murphy y col., ninguno de los pacientes que analizaron y se transformaron habían recibido tratamiento citorreductor^{310,311}. Dado el tratamiento del

paciente, se podría pensar que el tratamiento recibido pudo afectar a la estabilidad genética aumentando el riesgo de adquisición de alteraciones. Algún estudio reporta, explícitamente, que la presencia de alteraciones en *ASXL1* no se asocia al daño genómico producido por quimioterápicos, y que se detectan alteraciones en *ASXL1* en pacientes con MF primaria o secundaria que nunca han recibido ninguna quimioterapia, con lo que concluyen que se trata de eventos genéticos adquiridos relacionados con una inestabilidad genómica intrínseca al paciente ²⁶⁰.

Estos resultados sugieren que, en estos pacientes, pudo haber una expansión de una clona mutada ya presente en el momento del diagnóstico, pero que no se pudo detectar mediante las técnicas de biología molecular empleadas, o bien, que estas alteraciones se adquirieron durante el curso de la enfermedad, probablemente contribuyendo, en ambos casos, en la transformación de la TE ya fuese a mielofibrosis o a mielodisplasia.

En el grupo de PV o TE *JAK2V617F* positivos que evolucionaron a mielofibrosis también se pudo analizar varias muestras de los pacientes que presentaban diversas alteraciones simultáneamente, y en estos pacientes también se detectaron patrones de adquisición y expansión de las clonas mutadas heterogéneas.

En primer lugar, en la paciente con TE que presentaba coexistencia de mutaciones en *SF3B1* y *JAK2* se pudo detectar, mediante secuenciación masiva, la presencia de la mutación p.K666N de *SF3B1* en un 2,4% de las secuencias obtenidas (8 años antes de la transformación mielofibrótica) en contraste con un 45% observado en la muestra correspondiente al momento de la transformación. Estos resultados sugieren la expansión de la clona *SF3B1* positiva durante la evolución de la enfermedad. En este mismo paciente, la carga de *JAK2* también aumentó de un 8% al diagnóstico a un 92% en la fase mielofibrótica. Una posible explicación en este paciente es que en el momento del diagnóstico ya existiera una clona neoplásica minoritaria, portadora de la mutación en *SF3B1* y *JAK2*, y que esta clona se fuera expandiendo durante la evolución y la transformación a mielofibrosis hasta convertirse en una clona predominante, motivo por el cual se detecta la mutación de *SF3B1* en casi un 50% de las secuencias analizadas y la mutación de *JAK2* en el 92%. El aumento de la carga alélica de *JAK2* se debió, probablemente, al proceso de recombinación mitótica en la clona neoplásica, cosa que se pudo comprobar mediante estudios de LOH del cromosoma 9p (Figura 17). Para confirmar esta hipótesis, se hubiera necesitado un estudio de colonias de progenitores hematopoyéticos (tanto al diagnóstico como en la transformación), ya que podría ser que la recombinación mitótica no se hubiera producido durante la evolución de la enfermedad

sino que ya en el momento del diagnóstico existiera una clona minoritaria JAK2V617F homocigota y que fuera esta clona la que se expandiera durante el transcurso de la enfermedad (Tabla 18, paciente 6).

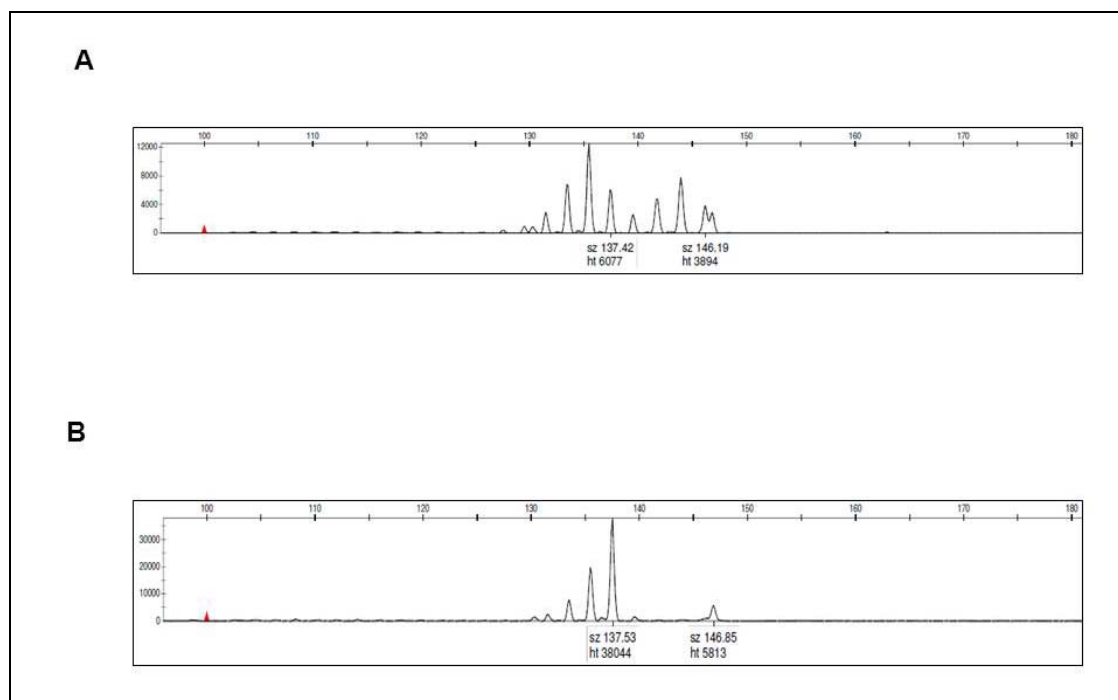


Figura 17: Electroferograma mostrando el patrón del análisis de microsatélites del polimorfismo D9S288 localizado cerca del locus de *JAK2*. A) Imagen que corresponde a la muestra del diagnóstico de la paciente 6, Tabla 18, en la que se observa un patrón de heterocigosidad para este polimorfismo. B) Imagen que corresponde a la muestra de la fase mielofibrótica en la que se observa una disminución de uno de los alelos y un aumento del segundo alelo sugiriendo un proceso de recombinación mitótica.

Por otro lado, en relación a los pacientes con PV evolucionados a MF, tan sólo disponíamos de muestra del diagnóstico en 2 de los 6 casos que presentaban alteraciones adicionales a *JAK2* (p.V617F o exón 12). La muestra del diagnóstico del paciente con MF post-PV portador de mutaciones en *SF3B1* y *SRSF2*, presentó la presencia de ambas mutaciones en un porcentaje similar, tanto al diagnóstico como en la transformación mielofibrótica dos años después (Tabla 18, paciente 7).

Finalmente, en una paciente con MF post-PV que presentaba mutaciones en *TET2* y *JAK2*, se observó la presencia de ambas mutaciones tanto al diagnóstico como en la fase mielofibrótica. Estudio en colonias de progenitores hematopoyéticos en la fase mielofibrótica, demostró que la mutación en *TET2* y la mutación en JAK2V617F estaban presentes en todas las colonias obtenidas, con lo cual se pudo confirmar que ambas

alteraciones formaban parte de la misma clona pero no se pudo establecer cuál fue el orden de adquisición de cada una de las alteraciones (Tabla 18, paciente 8).

En conjunto, todos estos resultados indican que la adquisición de alteraciones en genes como *TET2*, *ASXL1*, *SF3B1* y *SRSF2* y su evolución en el transcurso de la PV o la TE son muy heterogéneas, lo cual dificulta la decisión de en qué momento de la enfermedad se debería realizar el estudio mutacional, especialmente, de aquellos marcadores que pueden tener valor pronóstico, teniendo en cuenta que, varios pacientes no presentan las mutaciones en el momento del diagnóstico de la enfermedad sino que las adquieren durante la evolución de la misma y, en ocasiones, de estar presentes se encuentran en baja carga mutacional con lo que se precisa de técnicas de alta sensibilidad para poder detectarlas.

4.6. Detección de hematopoyesis clonal en personas sin evidencia de neoplasia hematológica

Hasta aquí se ha discutido la relevancia clínica de la detección de una hematopoyesis clonal, determinada mediante el estudio del PICX o el análisis de mutaciones, en relación a su valor pronóstico y su posible asociación con la progresión de la enfermedad. En ese sentido, existen trabajos como el de Lundberg y *col.*, que dan soporte a esa hipótesis ya que muestran que un 37% de las NM presentan alteraciones en genes que no son *JAK2* o *CALR* y que la presencia de dos o más mutaciones reducen significativamente la supervivencia global y aumentan el riesgo de transformación a LAM. Lo sorprendente de los resultados de este artículo es que la tasa de adquisición de mutaciones durante la progresión de una NM es baja y que el 95% de las mutaciones detectadas en los pacientes ya estaban presentes al diagnóstico, algunas de ellas en baja carga ²³⁸.

La detección de mutaciones distintas a *JAK2* o *CALR* en el momento del diagnóstico de una NM plantea la idea de que puedan tratarse de alteraciones iniciadoras de la expansión clonal y que, por tanto, se podrían detectar en la sangre de las personas antes de que se les diagnostique una neoplasia hematológica.

Ya a finales de los años 90, varios estudios reportaron clonalidad en un 30% de las mujeres mayores de 60 años mediante estudios del PICX ^{75,82,312,313}. Una de las posibles explicaciones para esta expansión clonal era la adquisición de alteraciones durante las sucesivas divisiones celulares, que aunque muchas de ellas podrían no tener algún impacto en la función celular, otras de ellas sí podrían estar confiriendo ventajas de autorenovación celular y/o proliferación, resultando en la expansión clonal de las células

afectas ³¹⁴. En el año 2012, Busque y col. publicaron un trabajo en el que mostraban que un 25% de las mujeres sanas mayores de 65 años presentaban una hematopoyesis clonal, que esta clonalidad se asociaba a alteraciones en la metilación del ADN, y que un 6% de estas mujeres mayores de 65 años con hematopoyesis clonal presentaban también, mutaciones en *TET2* ³¹⁵.

Recientemente, nuevos trabajos han ampliado esta información reportando que las mutaciones somáticas son frecuentes en la población general mayores de 70 años, detectándose en un 5-18% de los participantes sin evidencias de enfermedades hematológica, siendo el porcentaje variable dependiendo del estudio ³¹⁶⁻³¹⁸. Estas mutaciones se asocian a edad avanzada, siendo la frecuencia más elevada en participantes > de 90 años ³¹⁸.

Todos estos estudios coincidieron en que la mayoría de las mutaciones detectadas afectaban a genes ya conocidos por su implicación en el desarrollo de NM, como *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, seguidos de otros genes como *TP53* o *SF3B1* ^{316,318} u otros menos conocidos en este área como *PPM1D* ³¹⁷.

Esta detección de clonalidad se considera una condición pre-maligna que se asocia a un riesgo aumentado de mortalidad y de desarrollo de neoplasias hematológicas, ya que en uno de los trabajos un 31% de las personas a las que se les diagnosticó una neoplasia hematológica durante el seguimiento eran portadores de mutaciones ³¹⁸. De forma similar, en el trabajo de Genovese y col. un 42% de las neoplasias hematológicas se diagnosticaron en personas en las que se habían detectado mutaciones antes de que hubiera evidencia de enfermedad ³¹⁷.

En estos estudios se propone un modelo en el que se adquieren una serie de mutaciones precursoras que pueden provocar expansiones clonales de células madres o progenitores, y esta expansión clonal, junto con la adquisición de nuevas alteraciones, pueden desencadenar la aparición de una determinada neoplasia (Figura 18). Aunque se propone las alteraciones en *TET2*, *ASXL1* o *DNMT3A* como mutaciones iniciadoras, también hay evidencias de que estas alteraciones se pueden adquirir durante la progresión de la enfermedad, siendo otras variantes, como las que se han detectado en estos estudios con menor frecuencia u otras aun desconocidas, las responsables de la expansión clonal inicial.

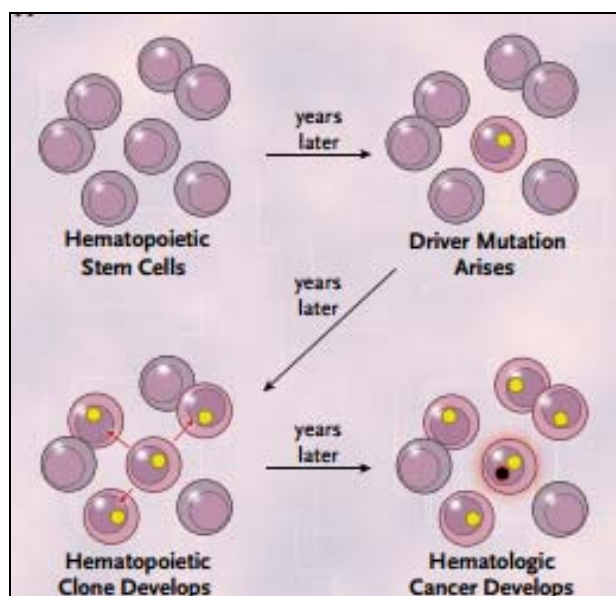


Figura 18: Expansión clonal de células hematopoyéticas (Genovese y col., 2014³¹⁷)

En esta figura se muestra la expansión clonal de una célula madre hematopoyética, bajo la influencia de una mutación somática (círculo amarillo) y la potencial conversión en neoplasia hematológica tras la adquisición de una nueva alteración (círculo negro con borde rojo).

En los trabajos presentados, no se ha analizado la muestra del diagnóstico de todos los pacientes en los que se detectó alguna mutación. Sin embargo, los resultados observados en aquellos pacientes en los que sí se pudo analizar la muestra del diagnóstico, son resultados muy heterogéneos, algunos de los cuales podría coincidir con este modelo de desarrollo de cáncer. Es decir, entre los pacientes analizados, varios de ellos presentaban mutaciones en *TET2*, *SF3B1* o *SRSF2* adicionales a *JAK2* o *CALR* en el momento del diagnóstico (Tabla 18, pacientes 6-8). Aunque no lo podemos comprobar, es posible que algunas de estas mutaciones ya estuvieran presentes en estas personas mucho antes de que se les diagnosticara la NM y tal vez la mutación de *JAK2* o *CALR* fueran mutaciones secundarias responsables del desarrollo final de la NM y su fenotipo. Por el contrario, en los trabajos presentados, junto con otros trabajos, también hay evidencias de que las mutaciones en *TET2* o *ASLX1* no sólo son mutaciones responsables de la expansión clonal pre-maligna sino que pueden tener un papel muy importante en la transformación y progresión de una NM ya que no se detectan al diagnóstico, a pesar de utilizar técnicas muy sensibles, sino que se adquieren durante la transformación de la enfermedad e incluso que aumentan la carga durante la progresión de la misma (Tabla 18, pacientes 3,5)^{198,260}. Estos casos sugerirían la

existencia de otros mecanismos u otras alteraciones responsables de la expansión clonal inicial, confirmando una vez más, la elevada heterogeneidad de mecanismos y alteraciones que pueden estar implicados en el desarrollo y progresión de las neoplasias mieloproliferativas.

4.7. Estudio de biomarcadores en la rutina diagnóstica de las neoplasias mieloproliferativas: algoritmo diagnóstico

La demostración de mutaciones en los genes *JAK2* o *MPL* forma parte de los criterios diagnósticos de las NM en las guías de la OMS 2008³¹⁹. El análisis simultáneo de estas alteraciones sería un gasto y una actividad extra en la rutina diagnóstica no justificados, de manera que varias publicaciones han sugerido algoritmos de trabajo para la realización ordenada de distintas pruebas moleculares para el estudio de pacientes con sospechas de NM, de manera que el estudio se realice de una forma eficiente y más económica.

Dentro de este algoritmo diagnóstico, ante la sospecha de una NM se debería realizar, en primer lugar, el *screening* de la mutación p.V617F en el exón 14 del gen *JAK2*.

En los pacientes en los que se sospeche una PV *JAK2*V617F negativa, porque presenten poliglobulia, hiper celularidad en médula ósea (con incremento de la eritropoyesis, megacariopoyesis o granulopoyesis) o bien niveles bajos de EPO, se les debería analizar la presencia de mutaciones en el exón 12 de *JAK2*. Lo mismo se debería hacer en los pacientes que presenten eritrocitosis aislada y no presenten la mutación *JAK2*V617F.

Por otro lado, las guías del *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) indican que la presencia de mutaciones en el gen *JAK2*, un hematocrito aumentado (> 0,52 en hombres; > 0,48 en mujeres) o una masa eritrocitaria aumentada (> 25% por encima del valor de referencia) es suficiente para el diagnóstico de la PV^{320,321}.

Uno de los criterios diagnósticos de la TE y la MFP es la exclusión del diagnóstico de una LMC³¹⁹ de manera que para realizar estos diagnósticos se debería analizar de forma previa o paralelamente al análisis de la mutación *JAK2*V617F, la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1* mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o mediante *fluorescence in situ hybridization* (FISH).

Antes de la descripción de mutaciones en el gen *CALR*, ante la sospecha de una MFP o una TE *JAK2V617F* negativa, una vez descartada la LMC, se debía determinar la presencia de alteraciones en el exón 10 del gen *MPL*.

La presencia de una mutación patogénica adquirida (*JAK2V617F* o *MPL*) y trombocitosis sostenida (niveles de plaquetas $> 450 \times 10^9$ /L), en ausencia de evidencia de otra patología mieloide ya sería suficiente para hacer el diagnóstico de TE ³²². En el caso de la MFP, la demostración de la mutación *JAK2V617F* o mutaciones en *MPL* es un criterio mayor ya que confirma la naturaleza primaria de la patología ³¹⁹.

4.7.1. Incorporación de nuevos marcadores moleculares en el algoritmo diagnóstico

La reciente descripción de las mutaciones en el gen *CALR* en un 50-70% de las TE y MF *JAK2V617F* negativas, supone el descubrimiento de la segunda mutación más frecuente en las NM Ph negativas clásicas después de la mutación p.V617F de *JAK2*. Por ese motivo, es altamente probable que sea el siguiente marcador de clonalidad que se incorporará en las próximas recomendaciones de la OMS para el diagnóstico de la TE y la MFP. Dada su elevada frecuencia, su análisis se debería realizar incluso antes que la determinación de mutaciones en *MPL* (Figura 19).

En el trabajo de Schnittger y col., en el que analizan una serie de 15542 pacientes con neoplasias mieloproliferativas Ph negativas, detectaron alteraciones en *TET2* en un 27% de los pacientes con TE y MFP, y mutaciones en *CBL* y *EZH2* en un 8 y 22% de los pacientes con MFP, respectivamente. Por este motivo, en el algoritmo planteado de este trabajo se incorporó la determinación de mutaciones en estos genes en los casos de TE o MFP *JAK2* y *MPL* negativos ³²³. De acuerdo a nuestros resultados, y los publicados en la literatura, el análisis de mutaciones en *TET2* y *ASXL1* aumentarían en un 8% el porcentaje de pacientes con TE *JAK2* negativos. Todos estos estudios fueron previos a la descripción de las mutaciones en el gen *CALR*, por lo que es muy probable que el porcentaje de pacientes con mutaciones en *TET2*, pero negativos tanto para *JAK2* como para *CALR*, sea significativamente inferior al observado si sólo se consideran los pacientes *JAK2* negativos. Por este motivo, dada su baja incidencia, el estudio de mutaciones en *TET2*, en general, tiene una utilidad diagnóstica muy limitada (Figura 19).

A pesar de su baja incidencia, existen algunos casos en los que las mutaciones en *TET2* han sido de utilidad para diagnosticar una NM no abierta. En el estudio de Verger y col.,

sugieren que en pacientes con trombosis esplácnica se debería descartar el diagnóstico de una NM aunque los niveles de células sanguíneas estén dentro de los rangos de normalidad. En este estudio, la detección de mutaciones en *TET2* fue de utilidad para detectar dos pacientes que habían sufrido trombosis esplácnica que presentaban mutaciones en *TET2* sin evidencia de una NM abierta. En estos casos, la detección de un marcador de clonalidad, sea *TET2* u otro marcador, puede modificar la elección terapéutica del paciente, aplicándole un tratamiento citorreductor para evitar recurrencias trombóticas³²⁴.

Recientemente, también se han publicado otros trabajos como el de Vannucchi *y col.*, en el que muestran que las mutaciones en el gen *ASXL1* tienen un valor pronóstico independiente en las MFP. De forma similar, aunque aún está por determinar, las alteraciones en los genes *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* e *IDH2* también parecen asociarse a peor supervivencia y mayor riesgo a transformación leucémica. Por tanto, todos estos genes serían genes candidatos a ser incorporados en el algoritmo de estudio molecular de las MFP, no tanto por su relevancia diagnóstica sino por su probable valor pronóstico.

Actualmente, la incorporación de estas determinaciones en el diagnóstico de rutina es costoso, especialmente si se emplean técnicas de secuenciación como la secuenciación Sanger, porque no se trata de mutaciones puntuales sino que en la mayoría de los casos se debe secuenciar todo el gen, como en *TET2* o *EZH2* y el extenso exón 12 de *ASXL1*, en el que se han detectado la mayoría de las alteraciones, aunque algunos estudios han reportado otras alteraciones fuera de esta región⁶⁶. Aun así, la implementación de tecnologías como la secuenciación masiva en los laboratorios de rutina permiten analizar múltiples genes simultáneamente, con lo que existe la oportunidad de poder generar paneles de genes asociados a la patología de interés y poder analizar varios genes a la vez, cada vez, a un coste más reducido.

La incorporación de nuevas tecnologías que permitan realizar un análisis genético exhaustivo, integrado en la rutina diagnóstica, contribuirá a un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad y de su evolución, pero también ayudará a un diagnóstico más afinado y a la identificación de marcadores moleculares que puedan tener valor pronóstico. Además, a medida que se desarrollen fármacos que potencialmente puedan actuar sobre estas moléculas alteradas o revertir su efecto, el análisis para la identificación de estas alteraciones será de elevada relevancia para aplicar un tratamiento personalizado en función del perfil molecular que presente la enfermedad de cada paciente.

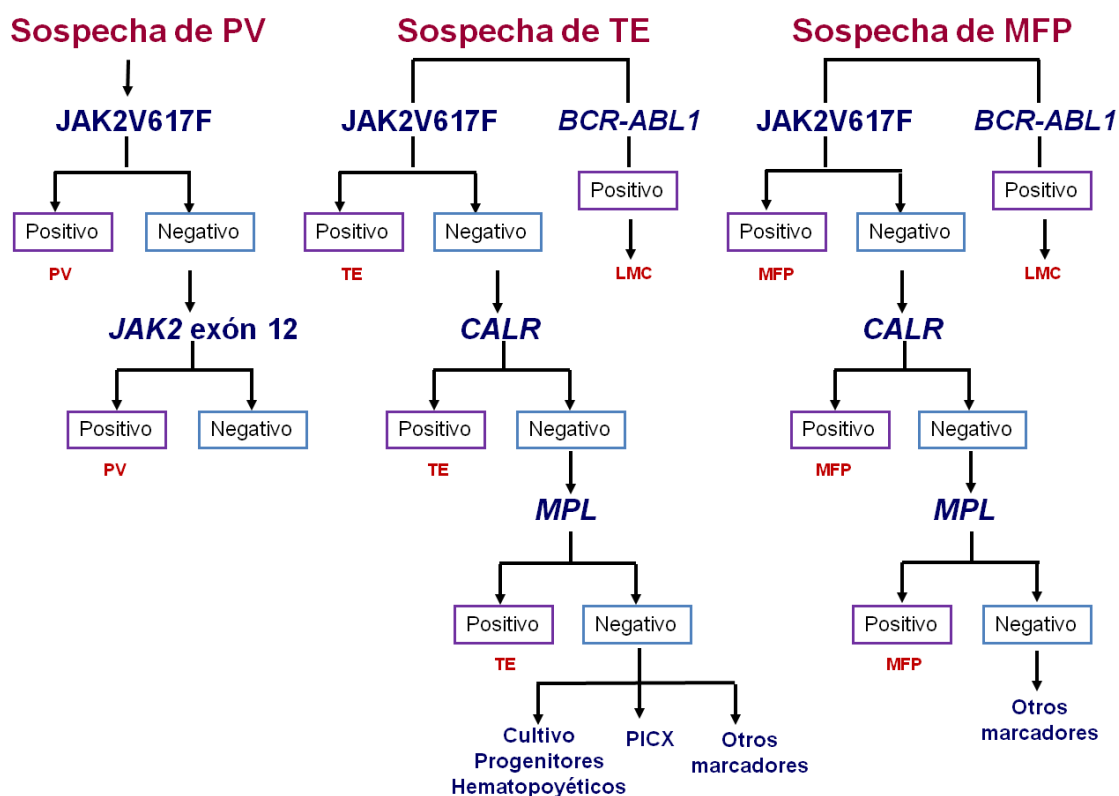


Figura 19: Algoritmo diagnóstico de las NM incorporando nuevos marcadores moleculares

4.7.2. Utilidad de la determinación de clonalidad mieloide para el algoritmo diagnóstico

Actualmente, con la determinación de mutaciones en *JAK2* (p.V617F y exón 12), el 97% de las PV tendrían un marcador de clonalidad y, de forma similar, con la determinación de la mutación *JAK2V617F* y las mutaciones en *CALR*, casi el 80-90% de las TE y MFP *JAK2* negativas también tendrían un marcador de clonalidad que ayude a establecer el diagnóstico de estas enfermedades. Aun así, existe un porcentaje minoritario de pacientes con NM clásicas Ph negativas sin un marcador de clonalidad y, en estos casos, el estudio de otros biomarcadores clásicos podría ser de utilidad, como por ejemplo, el estudio de clonalidad mieloide mediante el análisis del PICX, con la limitación de que este tipo de estudio sólo se puede realizar en mujeres.

La aplicación de estos estudios puede ser algo controvertida ya que no está claro cuál es la técnica y el gen de elección para llevar a cabo este tipo de análisis. Varios estudios

muestran que entre un 15-30% de las mujeres sanas pueden presentar una hematopoyesis clonal, analizada mediante el estudio del gen *HUMARA* u otros marcadores, y que el desequilibrio alélico es aún más acentuado en mujeres mayores de 60 años ^{75,82,312,313}.

En relación a los trabajos presentados, de 54 pacientes diagnosticadas de TE JAK2V617F negativas, detectamos una hematopoyesis clonal en un 41% de los casos analizados. De las 21 pacientes mujeres en las que se detectó un resultado positivo para el ensayo del gen *HUMARA*, 14 de ellas presentaban algún otro marcador molecular conocido como *CALR*, *MPL*, *TET2* o *ASXL1*. En tan sólo 7 pacientes se detectó una hematopoyesis clonal mediante el análisis del gen *HUMARA* pero no mediante la detección de otras mutaciones. Por tanto, en esta serie, el estudio del PICX en pacientes con sospecha de TE, sin otro marcador de clonalidad conocido, fue de utilidad aunque fuera en una minoría de los casos. Recientemente, el estudio de Allen y col. muestra como la detección de clonalidad mediante el estudio del PICX es infrecuente en los pacientes con TE triple negativos (9%). En este trabajo también reflejan una elevada correlación entre la detección de clonalidad mediante el PICX y la presencia de mutaciones en *CALR*, que es significativamente mayor (88%) a la observada en los pacientes con TE JAK2V617F positivos (26%) o triples negativos (9%). También reportan que las mutaciones en *CALR* tienen un gran impacto en la expansión de la clona mutada, siendo el porcentaje de neutrófilos portadores de la mutación de *CALR* muy superior (rango 54-100%) al porcentaje de neutrófilos mutados con la mutación JAK2V617F (rango 54%) ³²⁵.

Otra posibilidad para aumentar el número de casos informativos para estudios de PICX, sería analizar la expresión de otros polimorfismos, a nivel de ARN, en genes como *IDS*, *MPP1* entre otros. Según el estudio de Swierczek y col. este análisis no detectaría clonalidad en aquellas pacientes sanas, evitando así, posibles falsos positivos y proporcionando resultados más robustos ⁸³. Aun así, este sigue siendo un aspecto que necesita más estudios confirmatorios, ya que otros estudios contradicen estos resultados mostrando que un 40% de mujeres sanas muestran una hematopoyesis clonal ya sea mediante ensayos transcripcionales o mediante el análisis del gen *HUMARA* ⁸⁴.

En conclusión, actualmente el análisis de la clonalidad mieloide mediante el PICX puede tener utilidad diagnóstica especialmente en mujeres con sospecha de una NM, sin un marcador de clonalidad conocido, aunque los resultados deberían interpretarse con cautela en mujeres mayores de 60 años (Figura 19).

4.7.3. Utilidad del cultivo de progenitores hematopoyéticos en el algoritmo diagnóstico

El estudio de los cultivos *in vitro* de progenitores hematopoyéticos también puede ser de utilidad en aquellos casos de sospecha de NM de los que no se disponga de otro marcador de clonalidad, especialmente en ese 15-20% de las TE en las que no se detectan mutaciones en *JAK2*, *CALR* o *MPL*.

El estudio de Florensa y *col.* demostró la presencia de crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas en 38 de 60 (63%) pacientes con TE, así como crecimiento endógeno de colonias eritroides en 42 de 60 (70%) de los casos, lo cual indica que un 91% de los pacientes con TE presentaría crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas y/o eritroides y, por tanto, evidencia de un comportamiento mieloproliferativo. Por el contrario, ninguno de los 10 pacientes con trombocitosis reactiva ni de los 21 controles sanos, presentó crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas o eritroides. Por este motivo, cuando no se disponga de otro marcador de clonalidad, el cultivo *in vitro* de progenitores mieloides puede ayudar a realizar el diagnóstico diferencial entre un caso de TE y situaciones de trombocitosis reactiva ⁶⁹ (Figura19).

A pesar que el crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas parece ser más característico de la TE y no tanto de la PV, donde también se detecta en un 33-55% de los casos, este tipo de estudio sería útil para identificar una trombocitosis mieloproliferativa pero no es útil para discriminar entre el tipo de NM (TE *versus* PV).

En el trabajo presentado sobre 73 pacientes *JAK2V617F* negativos, se había realizado el cultivo de progenitores hematopoyéticos en 55 de las pacientes, durante el estudio inicial para determinar el diagnóstico. Del total de pacientes analizados, 21 de ellos (38%) presentaba un resultado positivo para el estudio del crecimiento endógeno de colonias eritroides o megacariocíticas. De los pacientes que presentaban crecimiento endógeno y en los que se disponía de resultados de mutaciones de *JAK2*, *MPL* y *CALR*, 7 de ellos no presentaban positividad para ningún marcador molecular adicional, indicando que en esta serie de pacientes el estudio de cultivos hematopoyéticos fue informativo y de utilidad diagnóstica en un 13% de los pacientes con TE triple negativos. En el estudio de Mondet y *col.* observaron crecimiento espontáneo de colonias eritroides y/o megacariocíticas en un 25% de los pacientes triples negativos. En este estudio también observaban que el crecimiento endógeno era más frecuente en los pacientes con TE que presentaban mutaciones en *JAK2* o *CALR* respecto a los triple negativos, y que, sin ser estadísticamente significativo, el crecimiento de colonias megacariocíticas era más

habitual en pacientes con mutaciones en *CALR* que en *JAK2*, mientras que el crecimiento de colonias eritroides era más frecuente en pacientes *JAK2V617F* positivos. Estos resultados refuerzan la evidencia del papel que tiene la mutación de *CALR* en la patogénesis de la TE *CALR* positiva en la que predomina un perfil megacariocítico en comparación con la TE *JAK2* positiva que presenta un perfil mixto (eritroide y megacariocítico) ³²⁶.

4.8. Consideraciones prácticas para el análisis molecular de los marcadores moleculares

Existen distintos aspectos que deben considerarse a la hora de realizar estudios de biología molecular. Durante el desarrollo de los estudios moleculares que se han llevado a cabo en los trabajos presentados, se han planteado una serie de cuestiones que pueden ser de relevancia a la hora de aplicar los estudios moleculares en la rutina diagnóstica y en el estudio molecular de las NM.

4.8.1. Tipo de muestra

En primer lugar, para el estudio de las NM, especialmente para la determinación de la mutación *JAK2V617F*, un punto de discusión es qué tipo de muestra debe utilizarse para el análisis: sangre total vs granulocitos purificados ³²⁷.

Algunos estudios muestran que la carga alélica de *JAK2V617F* es un 15% inferior en sangre periférica total respecto a granulocitos purificados, debido a la presencia de células hematopoyéticas no portadoras de la mutación como los linfocitos ³²⁸. En varias publicaciones se muestra que si se utilizan técnicas de alta sensibilidad como la PCR (*polymerase chain reaction*) cuantitativa aleloespecífica (sensibilidad < 1%) ^{328,329}, no hay diferencias entre el uso de sangre periférica total o granulocitos purificados mientras que si se utilizan técnicas menos sensibles como la PCR aleloespecífica en gel de agarosa, con una sensibilidad del 3% o la técnica de HRM el uso de sangre periférica puede dar más resultados falsos negativos, con lo que sería recomendable analizar granulocitos purificados ^{119,329}.

4.8.2. Ácidos nucleicos

En cuanto al tipo de ácidos nucleicos, según las guías del Reino Unido³³⁰, es preferible utilizar el ADN genómico como material de referencia dada su mayor estabilidad. También se podría extraer el ARN de la muestra y realizar una posterior reacción de retrotranscripción para llevar a cabo el análisis sobre el ADN complementario (ADNc).

En ciertas ocasiones, también se podría analizar el ARN extraído de las plaquetas, aunque no es una práctica extendida en la rutina diagnóstica. En este sentido, en el estudio de Bellosillo y *col.*, se mostró que el porcentaje de clona JAK2V617F positiva era mayor en las plaquetas que en los granulocitos de los pacientes con TE, mientras que esto no ocurría en pacientes con PV o MF/PFALTA CITA. Aunque en la rutina diagnóstica no se utilice las plaquetas como muestra a analizar, en casos con alta sospecha de TE en los que no se detectara la mutación de *JAK2* o bien se detectara una baja carga de la mutación en granulocitos, se podría considerar analizar de forma adicional las plaquetas del paciente para confirmar el resultado y evitar posibles falsos negativos.

La mayor parte de los estudios realizados en los trabajos de esta tesis se llevaron a cabo a partir del ADNc obtenido del ARN de granulocitos purificados. Uno de los problemas técnicos que surgió por el uso de este tipo de material fue la presencia de distintas variantes de *splicing* en el gen *TET2*. En algunas de las regiones analizadas, las secuencias obtenidas no eran valorables debido al solapamiento de múltiples secuencias. Al clonar los productos de PCR en un vector pCR4, y posterior secuenciación de las colonias individuales obtenidas a partir de bacterias TOP10 transformadas (Invitrogen), se pudo confirmar la presencia de tres variantes de *splicing* alternativo. Aunque la presencia de estas múltiples variantes no parece ser algo patológico, ya que se pudo comprobar que la expresión de estas variantes era similar entre los pacientes con NM y controles sanos, sí que supuso un problema a la hora de analizar este gen, con lo que una parte del análisis se debió confirmar a partir del ADN del paciente para excluir la presencia de posibles alteraciones en estas zonas que no eran valorables al analizarlas en el ADNc.

Por otro lado, la utilización de ADNc como material a analizar puede afectar a la interpretación de la mutación que existe realmente. En ese sentido, en los dos primeros trabajos se describió la presencia de un paciente con TE que presentaba coexistencia de mutaciones en *TET2* (p.V1395fs) y *ASXL1* (p.R634fs). En este paciente se realizó el análisis mutacional en el ADNc extraído de los granulocitos purificados en la fase crónica

de la TE. Posteriormente, este paciente evolucionó a SMD. Como no se disponía de ARN en la fase correspondiente a la mielodisplasia para confirmar la presencia de estas alteraciones, se realizó el análisis a partir del ADN extraído de granulocitos. En esta muestra, se pudo confirmar la presencia de la mutación de *ASXL1*, sin embargo, no se observó la deleción de cinco aminoácidos en el gen *TET2* que se había descrito en los trabajos previos. Por el contrario, se observó una alteración en el sitio aceptor del *splicing*, lo que probablemente estaba haciendo que se perdiera la funcionalidad del sitio aceptor original y se desplazara unos nucleótidos más hacia adelante donde existía otro dinucleótido AG, provocando una pérdida de los cinco aminoácidos que se veían delecionados inicialmente en el ADNc. Por tanto, una limitación del estudio molecular en este tipo de muestra es que se pueden no detectar algunas alteraciones que afecten al *splicing* u otras regiones reguladoras.

4.8.3. Técnica empleada

La elección de la técnica que se empleará para el estudio de los distintos marcadores también es un punto importante. Gran parte de los estudios presentados se llevaron a cabo mediante secuenciación Sanger que tiene una sensibilidad de alrededor del 20%.

A nivel de las pruebas diagnósticas que se están utilizando actualmente, como la detección de la mutación JAK2V617F, siempre es preferible utilizar una técnica más sensible como la PCR alelo específica en tiempo real, con una sensibilidad del 0,01-1%, que nos permita detectar la mutación en pacientes con una baja carga alélica o bien para monitorizar a los pacientes durante el curso de la enfermedad. Por otro lado, es conocido que los pacientes portadores de mutaciones en el exón 12 suelen presentar una carga alélica inferior a la que presentan los pacientes con la mutación JAK2V617F, con lo cual también se requiere de técnicas sensibles para su detección. Como las mutaciones en el exón 12 no son mutaciones puntuales sino que se han descrito múltiples alteraciones a lo largo del exón, su análisis mediante PCR alelo específica es más complicado y poco viable, con lo que se utilizan comúnmente otras técnicas como la técnica de HRM³³¹⁻³³³, ensayos con curvas de disociación¹²⁹ o técnicas de dHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*). También se ha descrito algún otro método basado en el bloqueo del alelo no mutado como el descrito por Laughlin y col., con el que se alcanza una sensibilidad del 0,1%³³⁴.

De forma similar, también se han reportado distintas técnicas para la detección de mutaciones en el aminoácido W515 de *MPL*, como ensayos de pirosecuenciación, PCR alelo específica¹⁵² o técnicas de más alta sensibilidad basadas en PCR alelo específicas en tiempo real^{305,335,336}. Como se han descrito varios cambios en la posición W515, así como alteraciones en el amino ácido S505, estas técnicas alelo específicas no son tan viables y en otros estudios se han empleado otras técnicas de *screening* de mutaciones en el exón 10 como la HRM¹⁵⁵ o técnicas basadas en el análisis de curvas de disociación^{150,158,337}.

Hasta el momento se han mencionado técnicas que se están empleando en la actualidad para el estudio de los biomarcadores que forman parte de los criterios diagnósticos actuales de la OMS 2008. Otro de los puntos a discutir sería qué técnica aplicar para el análisis de los nuevos marcadores susceptibles de ser analizados en algunos pacientes con NM. El primer punto a tener en cuenta es que los nuevos marcadores susceptibles a ser estudiados (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, entre otros), son genes en los que las alteraciones pueden ocurrir en una región amplia del gen, con lo cual, técnicas como la PCR alelo específica no sería adecuada, ya que no sería viable diseñar un ensayo específico para cada una de las posibles mutaciones que pudieran aparecer. Por tanto, una de las técnicas que serviría para realizar el *screening* de mutaciones sería la secuenciación Sanger, a pesar de su limitada sensibilidad. Este tipo de análisis es muy laborioso como para poder incluirlo en la rutina diagnóstica, por eso, la implementación de las nuevas tecnologías, como las técnicas de secuenciación masiva, puede ser de utilizad para incorporar el análisis de estos genes en el diagnóstico de las NM. Estas nuevas tecnologías permiten analizar un amplio número de genes a la vez, con una sensibilidad de hasta el 1%, permitiendo la detección de mutaciones presentes en una baja proporción de células. Cada vez más, se están diseñando distintos paneles de genes, específicos para cada tipo de neoplasia, con la finalidad de poder caracterizar molecularmente al paciente e identificar marcadores con valor diagnóstico, pronóstico y, en un futuro, con potencial valor predictivo.

La sensibilidad de la técnica también es un punto clave, ya que el uso de estas técnicas de secuenciación profunda permite la identificación de distintas sub clonas, aunque en muchas ocasiones se desconozca cuál es su relevancia clínica y biológica. En ese sentido, varios estudios han demostrado que al diagnóstico, pueden existir clonas minoritarias portadoras de ciertas alteraciones, que luego pueden ser las responsables de la recaída de ciertas enfermedades como las LAM y las que ofrecen resistencia al tratamiento³³⁸. Otros estudios han demostrado que la presencia de pequeñas clonas con

mutaciones (Ej. *TP53* o *ASXL1*), en fase crónica de una NM o un SMD, pueden ser las responsables, junto con la adquisición de otros eventos, de la progresión de la enfermedad, con lo cual, la detección de estas clonas, al diagnóstico, podría ser de utilidad para predecir un mayor riesgo de progresión de la enfermedad, en pacientes portadores de dichas mutaciones^{238,339,340}.

En los trabajos presentados, también se ha podido observar la presencia de clonas minoritarias que se expanden a lo largo del transcurso de la enfermedad, y que sólo se pueden detectar mediante la utilización de técnicas muy sensibles. En otros casos, a pesar de realizar análisis de alta profundidad, no se ha podido detectar la presencia de sub clonas mutadas al diagnóstico, pero sí en fases avanzadas, indicando que, en algunos casos, las mutaciones se adquieren a lo largo de la evolución de la enfermedad, indicando que la biología de las NM es muy heterogénea.

4.8.4. Interpretación de los resultados

El hecho de que no existan *hotspots* o mutaciones recurrentes en muchos de los genes mencionados anteriormente, hace más complicado la interpretación de los resultados obtenidos. Especialmente se dificulta la interpretación de mutaciones *missense* en las que se produce un cambio de un amino ácido por otro, en una determinada posición, o en el caso de las mutaciones silentes. En las mutaciones silentes, a pesar de que no se produce ningún cambio en la proteína, sí que se modifica la secuencia del ADN, con lo que no se puede excluir la posibilidad de que se vean afectados mecanismos de regulación o procesos de *splicing* del ARN mensajero, entre otros, que sí podrían tener consecuencias patogénicas. En los trabajos presentados, se detectaron múltiples variantes en la secuencia codificante de los genes *TET2* y *ASXL1*. Para poder discernir entre una mutación patogénica y un posible polimorfismo, en primer lugar, se realizó una búsqueda de información de las distintas variantes detectadas tanto en bases de datos como en publicaciones previas, para descartar los polimorfismos (SNPs) ya descritos. En estos casos, además es interesante comparar la presencia de las alteraciones tanto en el ADN tumoral como en el ADN no tumoral del mismo paciente para descartar la naturaleza somática de la alteración. De confirmarse la naturaleza somática, indicaría que la alteración es potencialmente patogénica. Por ese motivo, en nuestros estudios, también confirmamos la presencia de las alteraciones detectadas en *TET2* y en *ASXL1*, en el ADN extraído de las células mononucleadas o de linfocitos CD3⁺ (en los casos en los que se disponía de este material). Todas las variantes silentes o las que provocaban

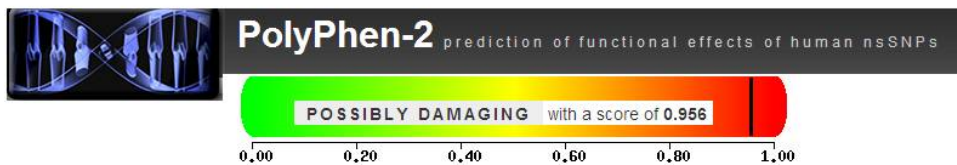
un cambio de amino ácido (*missense*) se detectaron en este material, sugiriendo que se trataban de SNPs, presentes en línea germinal. Para poder confirmar más verazmente estos resultados, se necesitaría de otro tipo de material más apropiado como ADN extraído de saliva o folículo piloso.

A pesar de estos estudios, la interpretación de algunas alteraciones sigue siendo controvertida, como la variante p.V1718L en el gen *TET2*. En el presente trabajo, esta variante se detectó en dos de los pacientes analizados y, en ambos casos, la variante se detectó tanto en los granulocitos como en las células mononucleadas, motivo por el cual, no se consideró, a priori, una mutación patogénica. Además, estudios *in silico* mostraron que esta variante no era potencialmente patogénica. Sin embargo, esta misma variante se ha descrito en otros artículos como una variante somática ya que no la detectaban en células de la mucosa bucal ¹⁸⁷.

Finalmente, cuando no se dispuso de material control, y no se encontró la mutación descrita con anterioridad, utilizamos una serie de herramientas bioinformáticas, como PolyPhen, la Align GVGD, o SIFT. Cada una de estas bases permite realizar análisis *in silico* de predicción de impacto de posibles mutaciones teniendo en cuenta distintos parámetros. Polyphen (*Phenotypic Polymorphisms*) es una herramienta que predice el impacto de la sustitución de un amino ácido en la estructura y la función de la proteína humana teniendo en cuenta consideraciones físicas y comparativas. El algoritmo SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) predice el potencial impacto de un cambio de amino ácido sobre la función de la proteína comparando la homología con otras secuencias cercanamente relacionadas. Este análisis parte de la base que las secuencias evolutivamente más conservadas entre especies son más intolerantes al cambio, con lo que cambios en esas regiones tendrían impacto en la función de la proteína sintetizada. Finalmente, el programa Align-GVGD combina las características biofísicas de los aminoácidos (composición, polaridad, volumen), con alineamientos múltiples de proteínas.

En el caso concreto de la mutación p.I671T en el gen *SF3B1* en un paciente con PV evolucionado a mielofibrosis, este tipo de análisis predijo que esta alteración estaba perjudicando la función de la proteína con una elevada probabilidad, de manera que se consideró una mutación patogénica en la interpretación de los resultados (Figura 20).

Análisis PolyPhen-2



Análisis SIFT

SIFT: PREDICTIONS **J. Craig Venter**
INSTITUTE

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000335321,I671T	ENSP00000335321	671	I	T	DAMAGING	0.01	2.96	193

Análisis Align GVGD

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Align GVGD

Substitution	GV	GD	Prediction
I671T	0.00	89.28	Class C65

$GD \geq 65 + \tan(10) \times (GV^{2.5}) \Rightarrow$ Class C65 \Leftrightarrow most likely

Figura 20: Resultados obtenidos de las bases bioinformáticas PolyPhen-2, SIFT y Align GVGD, en relación al potencial carácter patogénico de la mutación p.I671T del gen *SF3B1*

Aun así, para estar totalmente seguro de la capacidad patogénica de estas alteraciones se deberían hacer estudios funcionales para cada una de las alteraciones cuya relevancia esté por determinar, algo que no está al alcance de la gran mayoría de laboratorios de rutina.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

5.1 En la TE JAK2V617F negativa, la detección de una hematopoyesis clonal mediante el análisis del gen *HUMARA* se asocia con una mayor probabilidad de transformación mielofibrótica. De forma similar, existe una tendencia a que los pacientes que presentan hematopoyesis clonal detectada mediante la presencia de mutaciones en genes como *CALR*, *MPL*, *TET2* y *ASXL1* también desarrollen transformación de la enfermedad.

5.2 La presencia de mutaciones adicionales a *JAK2* en la TE y la PV podría tener un papel en la transformación de la enfermedad, con lo que su detección podría tener valor pronóstico.

5.3 El orden de adquisición de distintas alteraciones presentes en pacientes con TE o PV, y la evolución de las clonas durante el curso de la enfermedad es muy heterogénea entre los pacientes.

5.4 El perfil de mutaciones en los genes que codifican para proteínas en la maquinaria del *splicing* del ARN mensajero, es distinto entre los pacientes con MFP y los pacientes con MF post-TE o MF post-PV.

5.5 Las mutaciones en *TET2* y *ASXL1* son infrecuentes (< 10%) en pacientes con NM que carecen de mutaciones en *JAK2* o *MPL*, con lo que su utilidad en el diagnóstico de una NM es muy limitada.

5.6 Las mutaciones en los genes que codifican para proteínas en la maquinaria del *splicing* del ARN mensajero, como *SRSF2*, *SF3B1* y *U2AF1* son infrecuentes en pacientes con TE y PV en fase crónica de la enfermedad.

5.7 Las mutaciones en *IDH1*, *IDH2* y *c-CBL* no parecen estar implicadas en el desarrollo de una NM, ni en la transformación mielofibrótica de la TE y la PV.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Histology: The Lives and Deaths of Cells in Tissues*. 2002;
2. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science*. 1987;238(4832):1374–1379.
3. Han ZC, Caen JP. Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1994;7(1):65–89.
4. Hogge DE, Sutherland HJ, Cashman JD, et al. Cytokines acting early in human haematopoiesis. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1994;7(1):49–63.
5. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. *Hematology Basic Principles & Practice* (4th edition). Pennsylvania: Elsevier Churchill; 2005.
6. Metcalf D. Blood. Thrombopoietin—at last. *Nature*. 1994;369(6481):519–520.
7. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290–293.
8. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306(5940):277–280.
9. Melo J V, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature reviews.Cancer*. 2007;7(6):441–453.
10. DAMESHEK W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372–375.
11. Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 1974;290(24):1382.
12. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967;58(4):1468–1471.
13. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *The New England journal of medicine*. 1976;295(17):913–916.
14. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Experimental hematology*. 2002;30(3):229–236.
15. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England journal of medicine*. 2005;352(17):1779–1790.

16. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 2013;27(9):1874–1881.
17. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Annals of Internal Medicine*. 1995;123(9):656–664.
18. TC Pearson GW-M. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *The Lancet*. 1978;9:1218–1222.
19. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 2013;368(1):22–33.
20. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *Journal of clinical oncology* . 2005;23(10):2224–2232.
21. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood*. 1984;64(1):1–12.
22. Pearson TC. Diagnosis and classification of erythrocytoses and thrombocytoses. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1998;11(4):695–720.
23. Alvarez-Larrán A, Ancochea A, Angona A, et al. Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2012;97(11):1704–1707.
24. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014;28(7):1407–1413.
25. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *British journal of haematology*. 2009;146(5):504–509.
26. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008;22(2):437–438.
27. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;110(4):1092–1097.
28. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128–1132.
29. Manoharan A, Horsley R, Pitney WR. The reticulin content of bone marrow in acute leukaemia in adults. *British journal of haematology*. 1979;43(2):185–190.
30. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 2004;350(2):114–124.

31. Passamonti F, Malabarba L, Orlandi E, et al. Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica*. 2003;88(1):13–18.
32. Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Hernández-Boluda JC, et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Annals of hematology*. 2014;93(12):2037–2043.
33. Kiladjian J-J, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain J-D. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *Journal of clinical oncology* . 2011;29(29):3907–3913.
34. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology* . 2011;29(6):761–770.
35. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Cervantes F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(6):1363–1369.
36. Kiladjian J-J, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117(18):4706–4715.
37. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshour T, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α -2a. *Blood*. 2013;122(6):893–901.
38. Kiladjian J-J, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008;112(8):3065–3072.
39. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Grieshammer M, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(5):426–435.
40. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*. 1981;58(5):916–919.
41. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, et al. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *Journal of clinical oncology* . 1990;8(3):556–562.
42. Besses C, Cervantes F, Pereira A, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia*. 1999;13(2):150–154.
43. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2008;112(10):4061–4068.
44. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Talarn C, Gomez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability,

- presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *British journal of haematology*. 2002;118(3):786–790.
45. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *Journal of clinical oncology* . 2011;29(23):3179–3184.
 46. Rozman C, Giralto M, Feliu E, Rubio D, Cortes MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer*. 1991;67(10):2658–2663.
 47. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *The American Journal of Medicine*. 2004;117(10):755–761.
 48. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *The New England journal of medicine*. 1995;332(17):1132–1136.
 49. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353(1):33–45.
 50. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720–1728.
 51. Barbui T, Finazzi G. Management of essential thrombocythemia. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999;29(3):257–266.
 52. Barosi G, Besses C, Birgegard G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia*. 2007;21(2):277–280.
 53. Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2010;116(8):1205–10; quiz 1387.
 54. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978;51(2):189–194.
 55. Castro-Malaspina H. Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. *Progress in clinical and biological research*. 1984;154:427–454.
 56. Dalley A, Smith JM, Reilly JT, Neil SM. Investigation of calmodulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence for a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. *British journal of haematology*. 1996;93(4):856–862.
 57. Reilly JT. Pathogenesis and management of idiopathic myelofibrosis. *Baillière's clinical haematology*. 1998;11(4):751–767.
 58. Bock O, Höftmann J, Theophile K, et al. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. *The American journal of pathology*. 2008;172(4):951–960.

59. Cervantes F, Esteve J, Cobo F, Rozman C, Montserrat E. PA. Mielofibrosis idiopática: características iniciales, patrones evolutivos y supervivencia en una serie de 106 pacientes. *Med Clin (Barc)*. 1997;109:651–655.
60. Ward HP, Block MH. The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine*. 1971;50(5):357–420.
61. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895–2901.
62. Passamonti F, Rumi E, Caramella M, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood*. 2008;111(7):3383–3387.
63. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(4):392–397.
64. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861–1869.
65. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2012;120(20):4168–4171.
66. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1200–1202.
67. Hernandez-Boluda JCCF. Mielofibrosis idiopática. *Manual práctico de hematología Clínica*. 2015;207–214.
68. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(17):2635–2642.
69. Florensa L, Besses C, Woessner S, et al. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythaemia. *Leukemia*. 1995;9(2):271–273.
70. Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1998;11(4):819–848.
71. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Annals of hematology*. 2008;87(1):1–10.
72. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *European journal of haematology*. 2009;83(1):17–21.
73. Sever M, Quintás-Cardama A, Pierce S, et al. Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(12):2667–2670.

74. Wassie E, Finke C, Gangat N, et al. A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. *British journal of haematology*. 2015;169(1):71–76.
75. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 1997;97(4):920–926.
76. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood*. 1997;89(1):128–134.
77. El-Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leukemia & lymphoma*. 1998;30(1-2):181–188.
78. El Kassar N, Hetet G, Li Y, Brière J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *British journal of haematology*. 1995;90(1):131–137.
79. Shih LY, Lin TL, Dunn P, et al. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Experimental hematology*. 2001;29(2):202–208.
80. Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, et al. Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (Humara). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *American journal of clinical pathology*. 1999;112(1):93–100.
81. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood*. 1999;93(2):417–424.
82. Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *British journal of haematology*. 1997;98(3):512–519.
83. Swierczek SI, Agarwal N, Nussenzveig RH, et al. Hematopoiesis is not clonal in healthy elderly women. *Blood*. 2008;112(8):3186–3193.
84. Busque L, Paquette Y, Provost S, et al. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood*. 2009;113(15):3472–3474.
85. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106(4):1207–1209.
86. Jones A V, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(6):2162–2168.
87. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*. 1992;7(7):1347–1353.

88. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews*. 2009;228(1):273–287.
89. Zhao Y, Wagner F, Frank SJ, Kraft AS. The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(23):13814–13818.
90. Cacalano NA, Migone TS, Bazan F, et al. Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3-receptor interaction domain. *The EMBO journal*. 1999;18(6):1549–1558.
91. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(10):3387–3395.
92. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385–395.
93. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):161–170.
94. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(4):1448–1459.
95. Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B. Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. *FEBS letters*. 2003;546(1):1–5.
96. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003;101(8):2940–2954.
97. Levy DE, Darnell Jr JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews.Molecular cell biology*. 2002;3(9):651–662.
98. Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1999;21(1):47–52.
99. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews.Immunology*. 2003;3(11):900–911.
100. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, et al. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(8):754–759.
101. Shi S, Larson K, Guo D, et al. Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nature cell biology*. 2008;10(4):489–496.
102. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009;461(7265):819–822.
103. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723–1735.

104. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3377–3379.
105. Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(8):2920–2921.
106. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell*. 2005;7(4):387–397.
107. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144–1148.
108. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(24):22788–22792.
109. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999;98(2):181–191.
110. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*. 2002;30(9):990–1000.
111. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Experimental hematology*. 2004;32(2):179–187.
112. Liu F, Zhao X, Perna F, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer cell*. 2011;19(2):283–294.
113. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652–1660.
114. Bumm TG, Elsea C, Corbin AS, et al. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer research*. 2006;66(23):11156–11165.
115. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108(7):2435–2437.
116. Lasho TL, Mesa R, Gilliland DG, Tefferi A. Mutation studies in CD3+, CD19+ and CD34+ cell fractions in myeloproliferative disorders with homozygous JAK2(V617F) in granulocytes. *British journal of haematology*. 2005;130(5):797–799.
117. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;109(1):71–77.

118. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, et al. Extending Jak2V617F and MplW515 mutation analysis to single hematopoietic colonies and B and T lymphocytes. *Stem cells*. 2007;25(9):2358–2362.
119. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054–1061.
120. James C, Mazurier F, Dupont S, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood*. 2008;112(6):2429–2438.
121. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):4139–4141.
122. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377–1380.
123. Van Etten RA, Koschmieder S, Delhommeau F, et al. The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica*. 2011;96(4):590–601.
124. Chen E, Beer PA, Godfrey AL, et al. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer cell*. 2010;18(5):524–535.
125. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *American Journal of Hematology*. 2011;86(8):668–676.
126. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21(9):1960–1963.
127. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica*. 2007;92(12):1607–1614.
128. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(3):1686–1689.
129. 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(3):414–418.
130. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*. 2009;114(17):3538–3545.
131. Jeong EG, Kim SH, Kim MS, Lee SH, Yoo NJ. Absence of JAK2 exon 12 mutation in acute leukemias. *Acta Haematologica*. 2008;119(1):38–39.

132. Wu D, Dutra B, Lindeman N, et al. No evidence for the JAK2 (V617F) or JAK2 exon 12 mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*. 2009;18(3):144–149.
133. Beer PA, Jones A V, Bench AJ, et al. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *British journal of haematology*. 2009;144(6):904–908.
134. Li S, Kralovics R, De Libero G, et al. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008;111(7):3863–3866.
135. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *The New England journal of medicine*. 2007;356(5):459–468.
136. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366(9501):1945–1953.
137. Rothlisberger B, Huber A, Bargetzi M, Mendez A, Heizmann M. JAK2 exon 12 mutation in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(3):586–588.
138. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Experimental hematology*. 2007;35(11):1641–1646.
139. Butcher CM, Hahn U, To LB, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*. 2008;22(4):870–873.
140. Bernardi M, Ruggeri M, Albiero E, Madeo D, Rodeghiero F. Isolated erythrocytosis in V617F negative patients with JAK2 exon 12 mutations: report of a new mutation. *American Journal of Hematology*. 2009;84(4):258–260.
141. Kouroupi E, Zoi K, Parquet N, et al. Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. *British journal of haematology*. 2008;142(4):676–679.
142. Albiero E, Madeo D, Ruggeri M, et al. Loss of the JAK2 intramolecular auto-inhibition mechanism is predicted by structural modelling of a novel exon 12 insertion mutation in a case of idiopathic erythrocytosis. *British journal of haematology*. 2008;142(6):986–990.
143. Lakey MA, Pardani A, Hoyer JD, et al. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *American Journal of Clinical Pathology*. 2010;133(6):942–948.
144. Yeh YM, Chen YL, Cheng HY, et al. High percentage of JAK2 exon 12 mutation in Asian patients with polycythemia vera. *American Journal of Clinical Pathology*. 2010;134(2):266–270.
145. Yoo J-H, Park TS, Maeng H-Y, et al. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2009;189(1):43–47.
146. Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, et al. JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and

- increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*. 2010;24(5):1069–1073.
147. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *American journal of hematology*. 2013; 2013; 89(1):117–118.
 148. Mead AJ, Chowdhury O, Pecquet C, et al. Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood*. 2013;121(20):4156–4165.
 149. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocythosis. *Blood*. 2013; 23(7):1059–68.
 150. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472–3476.
 151. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS medicine*. 2006;3(7):e270.
 152. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141–149.
 153. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112(3):844–847.
 154. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557–1566.
 155. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernandez A, et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *British journal of haematology*. 2010;149(2):250–257.
 156. Pietra D, Brisci A, Rumi E, et al. Deep sequencing reveals double mutations in cis of MPL exon 10 in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011;96(4):607–611.
 157. Staerk J, Lacout C, Sato T, et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006;107(5):1864–1871.
 158. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocythosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009;94(1):141–144.
 159. Chaligne R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(10):3735–3743.
 160. Hussein K, Bock O, Theophile K, et al. Biclinal expansion and heterogeneous lineage involvement in a case of chronic myeloproliferative disease with concurrent MPLW515L/JAK2V617F mutation. *Blood*. 2009;113(6):1391–1392.
 161. Ding J, Komatsu H, Iida S, et al. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood*. 2009;114(15):3325–3328.

162. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198–4200.
163. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, et al. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(31):11444–11447.
164. Ohashi H, Arita K, Fukami S, et al. Two rare MPL gene mutations in patients with essential thrombocythemia. *International journal of hematology*. 2009;90(3):431–432.
165. Lambert MP, Jiang J, Batra V, Wu C, Tong W. A novel mutation in MPL (Y252H) results in increased thrombopoietin sensitivity in essential thrombocythemia. *American Journal of Hematology*. 2012;87(5):532–534.
166. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *British journal of haematology*. 2006;135(5):683–687.
167. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring MplW515L/K mutation. *British journal of haematology*. 2007;137(3):244–247.
168. Rudd CE. Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2001;2001(85):pe1.
169. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105(12):4604–4612.
170. Simon C, Dondi E, Chaix A, et al. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood*. 2008;112(10):4039–4047.
171. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(12):1599–1611.
172. Pardanani A, Lasho T, Finke C, et al. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*. 2010;24(10):1713–1718.
173. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nature reviews.Molecular cell biology*. 2005;6(12):907–918.
174. Naramura M, Nandwani N, Gu H, Band V, Band H. Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(37):16274–16279.
175. Kales SC, Ryan PE, Nau MM, Lipkowitz S. Cbl and human myeloid neoplasms: the Cbl oncogene comes of age. *Cancer research*. 2010;70(12):4789–4794.
176. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(24):6182–6192.

177. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, et al. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clinical cancer research* . 2010;16(15):3825–3831.
178. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, et al. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell cycle*. 2010;9(6):1051–1056.
179. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 1(Pt 16):2813–2819.
180. Suessmuth Y, Elliott J, Percy MJ, et al. A new polycythaemia vera-associated SOCS3 SH2 mutant (SOCS3F136L) cannot regulate erythropoietin responses. *British journal of haematology*. 2009;147(4):450–458.
181. Jost E, Do ON, Dahl E, et al. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2007;21(3):505–510.
182. Teofili L, Martini M, Cenci T, et al. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2008;123(7):1586–1592.
183. Fourouclas N, Li J, Gilby DC, et al. Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008;93(11):1635–1644.
184. Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129–1133.
185. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930–935.
186. Globisch D, Munzel M, Muller M, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PloS one*. 2010;5(12):e15367.
187. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144–147.
188. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900–904.
189. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009;360(22):2289–2301.
190. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. 2009;41(7):838–842.
191. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114(8):1628–1632.
192. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009;114(15):3285–3291.
193. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu R V, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403–6410.

194. Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *Journal of clinical oncology* . 2010;28(24):3858–3865.
195. Tefferi A, Lim K-H, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009;23(7):1343–1345.
196. Tefferi A, Pardanani A, Lim K-H, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905–911.
197. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839–843.
198. Schaub FX, Looser R, Li S, et al. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(10):2003–2007.
199. Schaub FX, Jager R, Looser R, et al. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F. *Blood*. 2009;113(9):2022–2027.
200. Swierczek SI, Yoon D, Bellanne-Chantelot C, et al. Extent of hematopoietic involvement by TET2 mutations in JAK2V(6)(1)(7)F polycythemia vera. *Haematologica*. 2011;96(5):775–778.
201. Abdel-Wahab O, Manshoury T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer research*. 2010;70(2):447–452.
202. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2010;29(49):6409–6417.
203. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(9):387–397.
204. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*. 2010;18(6):553–567.
205. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(6):1146–1151.
206. Prensner JR, Chinnaiyan AM. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nature medicine*. 2011;17(3):291–293.
207. Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010;465(7295):243–247.
208. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183–2186.

209. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2009;145(6):788–800.
210. Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current opinion in genetics & development*. 2004;14(2):155–164.
211. Martinez-Garcia E, Licht JD. Deregulation of H3K27 methylation in cancer. *Nature genetics*. 2010;42(2):100–101.
212. Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006;439(7078):871–874.
213. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation research*. 2008;647(1-2):21–29.
214. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics*. 2010;42(2):181–185.
215. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics*. 2010;42(8):722–726.
216. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009;136(4):701–718.
217. Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *The Journal of pathology*. 2010;220(2):152–163.
218. Will CL, Lührmann R. Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biological chemistry*. 2005;386(8):713–724.
219. Wachtel C, Manley JL. Splicing of mRNA precursors: the role of RNAs and proteins in catalysis. *Molecular bioSystems*. 2009;5(4):311–316.
220. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009;136(4):701–718.
221. Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu X-D. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Cell*. 2013;153(4):855-868.
222. Maciejewski JP, Padgett RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *British journal of haematology*. 2012;158(2):165–173.
223. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64–69.
224. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England journal of medicine*. 2011;365(15):1384–1395.
225. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239–6246.

226. Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia*. 2012;26(5):1135–1137.
227. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2530.
228. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;365(26):2497–2506.
229. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(14):3203–3210.
230. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(14):3211–3218.
231. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120(15):3080–3088.
232. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. 2012;44(1):53–57.
233. Zhang SJ, Rampal R, Manshoury T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*. 2012;119(19):4480–4485.
234. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25): 2379-2390.
235. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25): 2391-2405.
236. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*. 2009;417(3):651–666.
237. Wang W-A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(6):842–846.
238. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123(14):2220-2228.
239. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014; 28(7):1472-1477.
240. Fu R, Xuan M, Zhou Y, et al. Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia*. 2014; 1912-1914.

241. Broséus J, Park J-H, Carillo S, Hermouet S, Girodon F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. 2014;124(26):3964–3966.
242. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. *Blood*. 2013; 123(10):1552-1555.
243. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2013; 123(10):1544-1551.
244. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia*. 2014; 28(9):1811-1818.
245. Alvarez-Larrán A, Ancochea A, García M, et al. WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes. *British journal of haematology*. 2014; 166(6):911-919.
246. Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood*. 2003;102(10):3793–3796.
247. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, et al. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008;112(6):2199–2204.
248. Rumi E, Passamonti F, Pietra D, et al. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer*. 2006;107(9):2206–2211.
249. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(35):5630–5635.
250. Jones A V, Campbell PJ, Beer PA, et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(22):4517–4523.
251. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, et al. The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia*. 2010;24(1):110–114.
252. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics*. 2009;41(4):450–4.
253. Jones A V, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics*. 2009;41(4):446–9.
254. Hernández-Boluda J-C, Pereira A, Cervantes F, et al. A polymorphism in the XPD gene predisposes to leukemic transformation and new nonmyeloid malignancies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(22):5221–5228.

255. Varricchio L, Masselli E, Alfani E, et al. The dominant negative β isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients. *Blood*. 2011;118(2):425–436.
256. Poletto V, Rosti V, Villani L, et al. A3669G polymorphism of glucocorticoid receptor is a susceptibility allele for primary myelofibrosis and contributes to phenotypic diversity and blast transformation. *Blood*. 2012;120(15):3112–3117.
257. Passamonti F. Prognostic factors and models in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2011;11 Suppl 1:S25–7.
258. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Experimental hematology*. 2008;36(11):1480–1486.
259. Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, et al. Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations, and evolutionary pattern of JAK2V617F allele burden in polycythemia vera. *European journal of haematology*. 2015;94(3):251–7.
260. Stein BL, Williams DM, O’Keefe C, et al. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011;96(10):1462–1469.
261. Mills KI, McMullin MF. Mutational spectrum defines primary and secondary myelofibrosis. *Haematologica*. 2014;99(1):2–3.
262. Brecqueville M, Rey J, Devillier R, et al. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica*. 2014;99(1):37–45.
263. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipoiesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood*. 2004;104(12):3573–80.
264. Reilly JT, Barnett D, Dolan G, et al. Characterization of an acute micromegakaryocytic leukaemia: evidence for the pathogenesis of myelofibrosis. *British journal of haematology*. 1993;83(1):58–62.
265. Terui T, Niitsu Y, Mahara K, et al. The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood*. 1990;75(7):1540–1548.
266. Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F, et al. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood*. 2005;105(9):3493–3501.
267. Ponce CC, de Lourdes F Chauffaille M, Ihara SSM, Silva MRR. The relationship of the active and latent forms of TGF- β 1 with marrow fibrosis in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2012;29(4):2337–2344.

268. Papadantonakis N, Matsuura S, Ravid K. Megakaryocyte pathology and bone marrow fibrosis: the lysyl oxidase connection. *Blood*. 2012;120(9):1774–1781.
269. Lu M, Xia L, Liu Y-C, et al. Lipocalin produced by myelofibrosis cells affects the fate of both hematopoietic and marrow microenvironmental cells. *Blood*. 2015; 126(8):972-982.
270. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005;105(7):2664–2670.
271. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 2006;81(2):159–166.
272. Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 1996;88(3):1013–1018.
273. Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR. Leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms: therapy-related or unrelated? *Best practice & research. Clinical haematology*. 2014;27(2):141–153.
274. Hultcrantz M, Kristinsson SY, Andersson TM-L, et al. Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *Journal of clinical oncology* . 2012;30(24):2995–3001.
275. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108(10):3548–3555.
276. Theodorides A, Boissinot M, Girodon F, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood*. 2007;110(1):375–379.
277. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010;115(14):2891–2900.
278. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DHT, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(14):2882–2890.
279. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. P53 Lesions in Leukemic Transformation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(5):488–490.
280. Tallarico M, Odenike O. Secondary acute myeloid leukemias arising from Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms: pathogenesis, risk factors, and therapeutic strategies. *Current hematologic malignancy reports*. 2015;10(2):112–117.
281. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(50):E5401–10.
282. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009;113(20):4829–4833.

283. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(1):346–352.
284. Abdel-Wahab O. Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Current opinion in hematology*. 2011;18(2):117–123.
285. Pietra D, Casetti I, Da Vià MC, et al. JAK2 GGCC haplotype in MPL mutated myeloproliferative neoplasms. *American journal of hematology*. 2012;87(7):746–747.
286. Chou W-C, Hou H-A, Chen C-Y, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010;115(14):2749–2754.
287. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1058–1066.
288. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine*. 2010;362(4):369–370.
289. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24(7):1302–1309.
290. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell*. 2010;17(3):225–234.
291. Shih LY, Lin TL, Lai CL, et al. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood*. 2002;100(5):1596–1601.
292. Andrikovics H, Kraehling T, Balassa K, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014;99(7):1184–1190.
293. Randi ML, Barbone E, Fabris F, et al. Post-polycythemia myeloid metaplasia: experience with a large cohort of patients. *Journal of medicine*. 1994;25(6):363–369.
294. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(10):2224–2232.
295. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006;106(3):631–635.
296. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007;21(9):1952–1959.
297. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110(3):840–846.

298. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *American journal of hematology*. 2014; 89(5):517-523.
299. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Experimental hematology*. 2009;37(9):1016–1021.
300. Stein BL, Williams DM, Rogers O, et al. Disease burden at the progenitor level is a feature of primary myelofibrosis: a multivariable analysis of 164 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasm patients. *Experimental hematology*. 2011;39(1):95–101.
301. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107(9):3676–3682.
302. Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988–992.
303. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24(6):1128–1138.
304. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, chromosomes & cancer*. 2012;51(8):743–755.
305. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, et al. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2008;10(5):435–441.
306. Ricci C, Spinelli O, Salmoiraghi S, et al. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. *British journal of haematology*. 2012;156(3):404–407.
307. Koumakpayi IH, Diallo J-S, Le Page C, et al. Low nuclear ErbB3 predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *BJU international*. 2007;100(2):303–309.
308. Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*. 2010;24(9):1656–1657.
309. Cross NCP. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2011;2011:208–214.
310. Murphy S. Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Seminars in hematology*. 1999;36(1 Suppl 2):9–13.
311. Van de Pette JE, Prochazka A V, Pearson TC, et al. Primary thrombocythaemia treated with busulphan. *British journal of haematology*. 1986;62(2):229–237.

312. Busque L, Mio R, Mattioli J, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. 1996;88(1):59–65.
313. Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, et al. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clinical genetics*. 2004;66(4):327–332.
314. Busque L, Gilliland DG. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. *Leukemia*. 1998;12(2):128–35.
315. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature Genetics*. 2012;44(11):1179–1181.
316. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature medicine*. 2014;20(12):1472–8.
317. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2477-2487.
318. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2488–2498.
319. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman JW, IARC. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008. ISBN-13 9789283224310.
320. McMullin MF. The classification and diagnosis of erythrocytosis. *International journal of laboratory hematology*. 2008;30(6):447–459.
321. McMullin MF, Reilly JT, Campbell P, et al. Amendment to the guideline for diagnosis and investigation of polycythaemia/erythrocytosis. *British journal of haematology*. 2007;138(6):821–822.
322. Harrison CN, Bareford D, Butt N, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *British journal of haematology*. 2010;149(3):352–375.
323. Schnittger S, Bacher U, Eder C, et al. Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow. *Haematologica*. 2012;97(10):1582–1585.
324. Verger E, Andreoli A, Chomienne C, Kiladjian J-J, Cassinat B. TET2 gene sequencing may be helpful for myeloproliferative neoplasm diagnosis. *British journal of haematology*. 2014;165(3):416–419.
325. Allen C, Lambert JR, Linch DC, Gale RE. X chromosome inactivation analysis reveals a difference in the biology of ET patients with JAK2 and CALR mutations. *Blood*. 2014;124(13):2091–2093.
326. Mondet J, Park J-H, Menard A, et al. Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2015;100(5):e176–8.

327. Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow. *Leukemia*. 2008;22(1):194–195.
328. Hermouet S, Dobo I, Lippert E, et al. Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2(V617F). *Leukemia*. 2007;21(5):1128–1130.
329. Cankovic M, Whiteley L, Hawley RC, Zarbo RJ, Chitale D. Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods. *American journal of clinical pathology*. 2009;132(5):713–721.
330. Bench AJ, White HE, Foroni L, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *British journal of haematology*. 2013;160(1):25–34.
331. Jones A V, Cross NC, White HE, Green AR, Scott LM. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica*. 2008;93(10):1560–1564.
332. Rapado I, Grande S, Albizua E, et al. High resolution melting analysis for JAK2 Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2009;11(2):155–161.
333. Ugo V, Tondeur S, Menot M-L, et al. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS one*. 2010;5(1):e8893.
334. Laughlin TS, Moliterno AR, Stein BL, Rothberg PG. Detection of exon 12 Mutations in the JAK2 gene: enhanced analytical sensitivity using clamped PCR and nucleotide sequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010;12(3):278–282.
335. Laurent C, Demas V, Delabesse E, Brousset P. Detection of the MPL W515L mutation in bone marrow core biopsy specimens with essential thrombocythemia using the TaqMan assay. *Human pathology*. 2007;38(10):1581–1582.
336. Ghaderi M, Strömberg O, Porwit A. Rapid real-time PCR assay for detection of MPL W515L mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. *International journal of laboratory hematology*. 2010;32(1 Pt 2):122–126.
337. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia*. 2011;25(12):1834–1839.
338. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–510.
339. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(15):1971–1979.
340. Ferrer-Marín F, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, et al. Leukemic transformation driven by an ASXL1 mutation after a JAK2V617F-positive primary myelofibrosis: clonal evolution and

hierarchy revealed by next-generation sequencing. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:68.

ANEXOS

ANEXOS

Otras publicaciones elaboradas durante la realización de la Tesis.

Publicaciones como Autora:

- **Martínez-Avilés L**, Besses C, Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. Exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica*. 2007; 92, 674-7. Tipo de publicación: carta al editor. Factor de Impacto: 5,516

Publicaciones como Colaboradora:

- Bellosillo B, **Martínez-Avilés L**, Gimeno E, Florensa L, Longarón R, Navarro G, Salar A, Espinet B, Solé F, Serrano S, Besses C. A higher JAK2 V617F mutated clone is observed in platelets than in granulocytes from essential thrombocythemia patients but not in patients with polycythemia vera and myelofibrosis. *Leukemia*. 2007; 21: 1331-2. Tipo de publicación: carta al editor. Factor de Impacto: 6,924
- Álvarez-Larrán A, Bellosillo B, **Martínez-Avilés L**, Saumell S, Salar A, Abella E, Gimeno E, Serrano S, Florensa L, Sánchez-González B, Besses C. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol*. 2009; 146, 504-9. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,597
- Montagut C, Iglesias M, Arumí M, Bellosillo B, Gallén M, Martínez-Fernández A, **Martínez-Avilés L**, Cañadas I, Dalmases A, Moragón E, Lema L, Serrano S, Rovira A, Rojo F, Bellmunt J, Albanell J. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) impairs the response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2010; 102(7), 1137-1144. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,346
- Besses C, Álvarez-Larrán A, **Martínez-Avilés L**, Mojal S, Longarón R, Salar A, Florensa L, Serrano S, Bellosillo B. Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol*. 2011; 152(4):413-9. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,597
- Salido M, **Martínez-Avilés L**, Ademà V, Ferrer A, Espinet B, García-García M, Salar A, Besses C, Florensa L, Serrano S, Bellosillo B, Solé F. Absence of mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in splenic B-cell marginal zone lymphoma. *Leuk Res*. 2011; 35 (3):e23-4. Tipo de publicación: carta al editor. Factor de Impacto: 2,358
- Salido M, Pijuan L, **Martínez-Avilés L**, Galvan AB, Cañadas I, Rovira A, Zanui M, Martínez A, Longarón R, Solé F, Serrano S, Bellosillo B, Wynes MW, Albanell J, Hirsch FR, Arriola E. Increased ALK Gene Copy Number and Amplification are Frequent in Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(1): 21-27. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,547
- Hernández-Boluda JC, Álvarez-Larrán A, Gómez M, Angona A, Amat P, Bellosillo B, **Martínez-Avilés L**, Navarro B, Teruel A, Martínez-Ruiz F, Besses C. Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2011; 152(1): 81-88. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,597

- Pera M, Iglesias M, Puig S, **Martínez-Avilés L**, Bellosillo B. A Sporadic Multiple Gastrointestinal Stromal Tumor with Unique Clinical and Molecular features. *Hum Pathol.* 2011; 42(8):1194-9. Tipo de publicación: caso clínico. Factor de Impacto: 2,961
- Villa O, Mallo M, Kosyakova N, Salido M, Liehr T, **Martínez-Avilés L**, Pedro C, García-Aragonés M, Espinet B, Bellosillo B, Florensa L, Arenillas L, Cuscó I, Jurado LA, Solé F. Deletion of TET2 gene in an acute myeloid leukemia case with a t(4;15)(q24;q26) characterized by glass needle based chromosome microdissection and oligonucleotide array. *Leuk Res.* 2011; 35(9):e161-3. Tipo de publicación: carta al editor . Factor de Impacto: 2,555
- Alvarez-Larrán A, Angona A, **Martínez-Avilés L**, Bellosillo B, Besses C. Influence of JAK2 46/1 haplotype in the natural evolution of JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.* 2012; 36(3):324-6. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 2,923
- Alvarez-Larrán A, Ancochea A, Angona A, Pedro C, Garcia-Pallarols F, **Martínez-Avilés L**, Bellosillo B, Besses C. Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2012; 97(11):1704-7. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 6,532
- Mompradé E, **Martínez-Avilés L**, Arriola E. Two rare exon 21 EGFR mutations in patients treated with Gefitinib. *J Thorac Oncol.* 2013; 8(4):e36-7. Tipo de publicación: carta al editor. Factor de Impacto: 4,473
- Angona A, Bellosillo B, Alvarez-Larrán A, **Martínez-Avilés L**, Camacho L, Pairet S, Fernández-Rodríguez MC, Ancochea A, Besses C. Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamine. *Leuk Res.* 2013; 37(6):917-21. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 2,58
- Hussein K, Percy M, McMullin MF, Schwarz J, Schnittger S, Porret N, **Martínez-Avilés L**, Bellosillo B, Giraudier S, Skoda R, Lippert E, Hermouet S, Cario H. Clinical utility gene card for: hereditary thrombocythemia. *Eur J of Hum Genet.* 2014; 22(2). Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,319
- Ferrer-Marín F, Bellosillo B, **Martínez-Avilés L**, Soler G, Carbonell P, Luengo-Gil G, Caparrós E, Torregrosa JM, Besses C, Vicente V. Leukemic transformation driven by an ASXL1 mutation after a JAK2V617F-positive primary myelofibrosis: clonal evolution and hierarchy revealed by next-generation sequencing. *J Hematol Oncol* 2013;8(1):68. Tipo de publicación: carta al editor. Factor de Impacto: 4,46
- Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Carlos Hernández-Boluda J, **Martínez-Avilés L**, Fernández-Rodríguez C, Gómez M, Lombardía L, Angona A, Ancochea A, Senín A, Longarón R, Navarro B, Collado M, Besses C. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol.* 2014; 89(5):517-23. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,138
- Luque A, **Martínez-Avilés L**, Arriola E. A complex deletion/insertion on exon 19 of the EGFR gene predicts response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol.* 2014; 9(6):e47-8. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,473
- Alvarez-Larrán A, Ancochea A, Garcia M, Climent F, García-Pallarols F, Angona A, Senín A, Barranco C, **Martínez-Avilés L**, Serrano S, Bellosillo B, Besses C. WHO-histologic criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes. *Br J Haematol.* 2014; 166(6):911-9. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,942

- Senín A, Arenillas L, **Martínez-Avilés L**, Fernández-Rodríguez C, Bellosillo B, Florensa L, Besses C, Alvarez-Larrán A. Caracterización molecular de la leucemia mieloide crónica atípica y la leucemia neutrofilia crónica. *Med Clin (Barc)*. 2014; 144(11):487-90. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 1,399
- Alvarez-Larrán A, **Martínez-Avilés L**, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, Antelo ML, Gómez-Casares MT, Durán A, Marcote B, Ancochea A, Senín A, Angona A, Gómez M, Vivente V, Cercantes F, Bellosillo B, Besses C. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Ann Hematol*. 2014; 93(12):2037-43. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 2,87
- Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, **Martínez-Avilés L**, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Longarón R, Ancochea A, Senín A, Florensa L, Besses C. Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations and evolutionary pattern of JAK2V617F allele burden in polycythemia vera. *Eur J Haematol*. 2015; 94(3):251-7. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 2,412
- Ancochea A, Alvarez-Larrán A, Morales-Indiano C, García-Pallarols F, **Martínez-Avilés L**, Angona A, Senín A, Bellosillo B, Besses C. The role of serum EPO level and JAK2V617F allele burden in the diagnosis of polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2014; 167(3):411-7. Tipo de publicación: artículo. Factor de Impacto: 4,942

