



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina



Universitat Autònoma de Barcelona

**" CARACTERIZACIÓN DE LOS PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS CD34+ EN LAS NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS Y SU PAPEL EN LA
EVOLUCIÓN DE LA CARGA MUTACIONAL ”**

Tesis presentada por

ANNA ANGONA FIGUERAS

para optar al grado de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Carles Besses Raebel y Dr. Alberto Alvarez Larrán en el Servicio de Hematología del Hospital del Mar y la tutoría del Dr. Sierra Gil

Tesis adscrita al Programa de Doctorat en Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Anna Angona Figueras

Doctoranda

Barcelona, marzo 2017

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Medicina



Universitat Autònoma de Barcelona

**" CARACTERIZACIÓN DE LOS PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS CD34+ EN LAS NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS Y SU PAPEL EN LA
EVOLUCIÓN DE LA CARGA MUTACIONAL "**

Tesis presentada por

ANNA ANGONA FIGUERAS

para optar al grado de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Carles Besses Raebel y Dr. Alberto Alvarez Larrán en el Servicio de Hematología del Hospital del Mar y la tutoría del Dr. Sierra Gil

Tesis adscrita al Programa de Doctorat en Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Anna Angona Figueras
Doctoranda

Dr. Besses Raebel
Director de tesis

Dr. Alvarez Larrán
Director de tesis

Barcelona, marzo 2017



Universitat Autònoma de Barcelona

El Dr. CARLES BESSES RAEBEL, doctor en Medicina, Jefe de Servicio de Hematología del Hospital del Mar de Barcelona, el Dr. ALBERTO ALVAREZ LARRÁN, doctor en Medicina, Adjunto del Servicio de Hematología Hospital del Mar de Barcelona, y el Dr. JORDI SIERRA GIL, doctor en Medicina, Jefe de Servicio de Hematología del Hospital de Sant Pau de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "CARACTERIZACIÓN DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CD34+ EN LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS Y SU PAPEL EN LA EVOLUCIÓN DE LA CARGA MUTACIONAL", presentada por ANNA ANGONA FIGUERAS, para acceder al título de Doctora en Medicina, se ha realizado bajo su dirección y su tutela, respectivamente, considerando que reúne los requisitos formales y científicos adecuados para su preceptiva lectura y defensa públicas.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación a Barcelona, a día 15 de marzo de 2017.

Dr. Carles Besses Raebel

Dr. Alberto Alvarez Larrán

Dr. Jordi Sierra Gil

Als meus pares

A en David, en Quim i a la Maria

En primer lloc m'agradaria dedicar aquesta tesi als meus directors. Al Dr. Besses, perquè aprendre al seu costat, des de la meva arribada a l'Hospital com a resident fins avui, ha estat tot un privilegi. A l'Alberto, pel seu gran sentit crític i pel seu rigor per fer les coses ben fetes. Gràcies a tots dos per donar-me l'oportunitat de fer aquesta tesi!

A tots els companys i companyes del Servei d'Hematologia, perquè han estat imprescindibles en aquest llarg camí. Gràcies, Eugènia, per tot el que m'has ensenyat! Gràcies, *Xikis* de la 60! Ha estat un any genial a la 60 amb vosaltres. A tu, Francesc, perquè sempre que he tingut un problema amb estadística, amb la informàtica, amb bases de dades, amb qualsevol cosa, sempre has estat disposat a solucionar-ho de bon grat. A tots els residents més petits i més grans amb qui he coincidit! De tots vosaltres n'he après infinitat de coses! Heu estat els millors companys que podia tenir! A l'Anna, per la seva ajuda en la revisió d'aquesta tesi. Quina feinada deixar l'índex ben alineat!

A la Bea, per deixar-me seure al seu despatx molts matins amb mil dubtes de biologia apuntats, i sense voler sortir-ne fins a entendre-ho tot. Gràcies per ser una directora més d'aquesta tesi. Gràcies a tota la gent del seu laboratori pel seu suport metodològic.

A tot el Grup de Recerca. A la Laura, a la Conchi i a la Silvia, per tenir la gran paciència d'ensenyar-me a moure'm per un laboratori, d'aclarir-me aquells dubtes més bàsics de la biologia, i per no tenir un "no" per resposta! Res de tot això no hauria estat possible sense vosaltres. Aquesta tesi és vostra! A la Raquel, per cuidar les meves *cel·luletes* com ho has fet!

A tots els companys i companyes dels Laboratoris de Citologia i Citogenètica, per tota la vostra col·laboració en tot moment. A la Dra. Florensa, per tot l'entusiasme en el coneixement que transmet cada dia!

A tots els infermers i infermeres, auxiliars i resta de personal de la 60, Hospital de Dia i Consultes Externes, per posar-me les coses tan fàcils!

Deixant l'Hematologia, però sense marxar de l'Hospital del Mar, a tots els *coR* que vam començar junts la residència ja fa uns anys. A la Irene, perquè ha estat una peça importantíssima tots aquests anys, tant dins com fora de

l'Hospital! Al Dr. Payà, perquè m'ha ajudat i m'ha motivat a seguir fent la tesi abans, durant i després dels embarassos! Perquè en una visita després del naixement de la Maria em va convèncer que no havia d'abandonar la tesi!

A la Fundació IMIM, per la seva ajuda en l'enquadernació d'aquesta tesi.

A tots els becaris i becàries que mes rere mes lluitem entre convocatòries de beques i CV per aconseguir tenir un mínim sou a final de mes.

I ja fora de l'Hospital:

A les PesolEt! Al pis de Calàbria, a *Hilton Diagonal* i després ja repartides per Catalunya, han estat immenses! Roger, Oriol, Jaume, mil gràcies també a vosaltres!

A les Titis Bàsquet! Des dels 13 anys hem passat mil històries juntes... i les que ens queden! I no us n'escapareu: tenim un partit de bàsquet pendent! Emma i Jordi, sou els millors!

A en Carles! Ens vam conèixer sent capitans al GEiEG i tot el que hem anat compartint des de llavors... Moltíssimes gràcies per tots i cadascun d'aquests moments!

I en especial, gràcies a la meva família. Tots ells han estat imprescindibles en aquest camí. Als meus pares, perquè sóc com sóc gràcies a ells! Mil gràcies per tot l'esforç que heu fet perquè hagi arribat aquí. Us ho dec tot! Als meus avis, per tot el que em van ensenyar, especialment la cultura de l'esforç! A la meva germana, en Dani, en Jan i l'Àlex, perquè són imprescindibles en el meu dia a dia. A la meva família adoptiva de Moià, per ser-hi sempre! A en David, per estar sempre al meu costat. Pel seu optimisme, per la seva excel·lent racionalitat i per la seva paciència en aquesta aventura! Ets el millor company de viatge que podia tenir! Gràcies, Quim i Maria, per fer-me la mare més feliç del món. Sou els millors!

ÍNDICE

Tablas y figuras	9
Lista de abreviaturas	11
Introducción	15
1. Hematopoyesis	16
1.1. Introducción	16
1.2. Marcadores moleculares de las células hematopoyéticas	18
1.3. Regulación de la hematopoyesis	20
1.3.1. Microambiente medular y <i>stem cells</i>	20
1.3.2. Factores de crecimiento y factores inhibitorios	21
2. Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)	23
2.1. Introducción	23
2.2. Neoplasias mieloproliferativas con mutación <i>JAK2</i>	25
2.2.1. Gen <i>JAK2</i>	25
2.2.2. Mutación <i>JAK2V617F</i>	27
2.2.3. Hematopoyesis de las NMP <i>JAK2</i> mutadas	28
2.2.3.1. Modelos murinos	30
2.2.4. Factores que intervienen en el desarrollo del fenotipo de NMP <i>JAK2</i>	35
2.2.5. Carga mutacional en las NMP <i>JAK2V617F</i>	40
2.2.6. Mutaciones en el exón 12	45
2.3. Neoplasias mieloproliferativas con mutación de <i>CALR</i>	46
2.3.1. Gen <i>CALR</i>	46
2.3.2. Mutaciones de <i>CALR</i>	47
2.3.3. Hematopoyesis de las NMP con mutación de <i>CALR</i>	51
2.3.4. Carga mutacional en las NMP <i>CALR</i> mutadas	55
2.4. Neoplasias mieloproliferativas con mutación de <i>MPL</i>	56
2.5. Complejidad clonal	58
Hipótesis de trabajo y objetivos	69

Resultados	71
<i>Trabajo 1</i>	
Dominancia clonal, mutaciones en las <i>stem cells</i> y patrón evolutivo de <i>JAK2V617F</i> en la policitemia vera	
- Resumen	73
- Copia del artículo	75
 <i>Trabajo 2</i>	
Caracterización de los progenitores hematopoyéticos CD34+ en las neoplasias mieloproliferativas <i>JAK2V617F</i> y <i>CALR</i> mutadas	
- Resumen	83
- Copia del artículo	84
 <i>Trabajo adicional</i>	
Dinámica de la carga mutacional de <i>JAK2V617F</i> en las células progenitoras CD34+ en pacientes en tratamiento con ruxolitinib	
- Resumen	90
Discusión	91
<i>Trabajo 1.</i> Dominancia clonal, mutaciones en las <i>stem cells</i> y patrón evolutivo de <i>JAK2V617F</i> en la policitemia vera	
	92
 <i>Trabajo 2.</i> Caracterización de los progenitores hematopoyéticos CD34+ en las neoplasias mieloproliferativas <i>JAK2V617F</i> y <i>CALR</i> mutadas	
	95
 <i>Trabajo adicional.</i> Dinámica de la carga mutacional del <i>JAK2V617F</i> en las células progenitoras CD34+ en pacientes en tratamiento con ruxolitinib	
	99
Conclusiones	101
Bibliografía	103

Anexo	129
<i>Trabajo adicional</i>	
Dinámica de la carga mutacional de <i>JAK2V617F</i> en las células progenitoras CD34+ en pacientes en tratamiento con ruxolitinib	
- Copia	131

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016

Tabla 2. Resumen de los modelos murinos *knock-in JAK2V617F*

Tabla 3. Resumen de los estudios que correlacionan la carga mutacional de *JAK2V617F* con la transformación a MF

Tabla 4. Frecuencia y distribución de las mutaciones adquiridas en las NMP Ph negativas.

FIGURAS

Figura 1. Esquema de los mecanismos fisiológicos de la hematopoyesis

Figura 2. Esquema de la hematopoyesis humana

Figura 3. Esquema de la interacción entre las células stem cell hematopoyéticas y el microambiente de la médula ósea

Figura 4. Esquema de la función de los factores de crecimiento en la hematopoyesis normal

Figura 5. Esquema de la estructura de la proteína JAK2 y localización de las principales mutaciones descritas

Figura 6. Esquema de las vías de señalización de la proteína JAK2

Figura 7. Factores que influyen en el fenotipo de las NMP *JAK2V617F*

Figura 8. Representación del mecanismo de recombinación mitótica que produce la pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 9p.

Figura 9. Mecanismo de acción de JAK2 y modelo de activación de STAT1 y STAT5 en la PV y TE

Figura 10. Esquema de los dominios funcionales de la proteína CALR

Figura 11. Mecanismo de acción de la proteína CALR mutada

Figura 12. Representación esquemática de las diferencias en la amplificación entre *CALRdel52* y *CALRins5*

Figura 13. Representación del mecanismo de acción del receptor de la trombopoyetina (MPL).

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG2: Arginase 2

ARN: Ácido Ribonucleico

AKT: *PKB, threonine protein kinase B*

ASXL1: *Additional Sex Combs-Like 1*

BFU-E: unidad formadora de colonias eritroides (*Burst Forming Units-Erythroid*)

BFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas (*Burst Forming Units-Megakaryocyte*)

CALR: *Calreticulina*

CBL: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*

CFC-G: unidad formadora de colonias granulocíticas (*Colony Forming Units-Granulocytic*)

CFC-M: unidad formadora de colonias macrofágicas (*Colony Forming Units-Macrophage*)

CFU-LM célula madre linfomieloide

CFC-GM: unidad formadora de colonias granulocíticas-macrofágicas (*Colony Forming Units-Granulocyte- Macrophage*)

CFU-Bas: unidad formadora de colonias basófilas (*Colony Forming Units-Basophil*)

CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides (*Colony Forming Units-erythroid*)

CFU-Eos: unidad formadora de colonias eosinofílas (*Colony Forming Units-Eosinophil*)

CFU-L: célula germinal linfoide

CFU-M: célula germinal mieloide

CFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas (*Colony Forming Unit-Megakaryocyte*)

CLP: progenitor linfoide común

CMP: progenitor mieloide común

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3 A*

EPO: eritropoyetina

ERK: *extracellular signal-regulated kinase 1*

EZH2: enhancer of zeste homolog 2

FEC: factores estimulantes de colonias

FERM: Dominio homólogo a proteínas Ezrina, Radixina y Moesina

FLT3-L: ligando FLT3

FSC-GM: factor estimulante de colonias granulomonocíticas

FSC-M: factor estimulante de colonias monocítica

FSC-G: factor estimulante de colonias granulocíticas

G6PD: glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa

G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulomonocíticas

HPC: Célula progenitora Hematopoyética (*Hematopoietic Progenitor Cell*)

HSC: Célula Madre Hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)

HU: hidroxurea

IDH1/2: Isocitrate dehydrogenase 1/2

IFN-peg: interferón pegilado

IL: interleucinas

JAK2: *Janus kinase 2*

JH: homología de *JAK*

KDEL: lisina (K), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), leucina (L)

KI: *Knock-in*

LA: leucemia aguda

LDH: lactato deshidrogenasa

LEC: leucemia eosinofílica crónica

LMC: leucemia mieloide crónica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

LNC: leucemia neutrofilia crónica

LNK: *Lymphocyte Adaptor Protein*

LOH pérdida de la heterocigosidad (*Loss of Heterozygosity*)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinasa*

MECOM: *MDS1 and EVI1 complex locus*

MF: mielofibrosis

MIP-1 α : proteína inflamatoria del macrófago

MFP: mielofibrosis primaria

MPL: *Myeloproliferative Leukemia Protooncogen*

NFE2: nuclear factor, erythroid 2

NMP: Neoplasias Mieloproliferativas

NOD/SCID: *non-obese diabetic-severe combined immunodeficient*

OMS: Organización Mundial de la Salud

Ph: Cromosoma Philadelphia (*Chromosome Philadelphia*)

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*

PICX: patrón de inactivación del cromosoma X

PRC2: *Polycomb Repressor Complex 2*

PV: policitemia vera

RARS: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

RARS-t: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis

RM: respuesta molecular

SCF: factor de células madre (*Stem Cell Factor*)

SF3B1: *Splicing Factor 3B, Subunit 1*

SH2B3: *SH2B Adaptor Protein 3*

SLC14A1: *Solute Carrier Family 14 Member 1*

SLC14A2: *Solute Carrier Family 14 Member 2*

SMD: Síndrome Mielodisplásico

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SRSF2: *Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TE: trombocitemia esencial

TERT: *telomerase reverse transcriptase*

TET2: *Ten-Eleven Translocation-2*

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TP53: *Tumor Protein 53*

TPO: trombopoyetina

U2AF1: *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor*

wt: no mutado (*Wild-type*)

INTRODUCCIÓN

1. HEMATOPOYESIS

1.1. Introducción

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico de formación, desarrollo y diferenciación de los distintos elementos formes de la sangre a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC). En el adulto la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea, dónde estas células precursoras hallan el lecho y el microambiente adecuados para el desarrollo y diferenciación hacia células maduras.

Las células hematopoyéticas más inmaduras no son reconocibles mediante técnicas microscópicas debido a la ausencia de distintivos morfológicos precisos. Gracias a técnicas de cultivo *in vitro* o con marcaje de antígenos de diferenciación con anticuerpos monoclonales se ha identificado una célula madre pluripotente con capacidad de proliferación, diferenciación y autorrenovación, conocida como HSC, cuya frecuencia es entre el 0,01% y el 0,2% de las células mononucleadas medulares ^{1,2}. Los tres mecanismos fisiológicos básicos que intervienen en la hematopoyesis y caracterizan a las HSC son la autorrenovación, la diferenciación y la apoptosis (Figura 1).

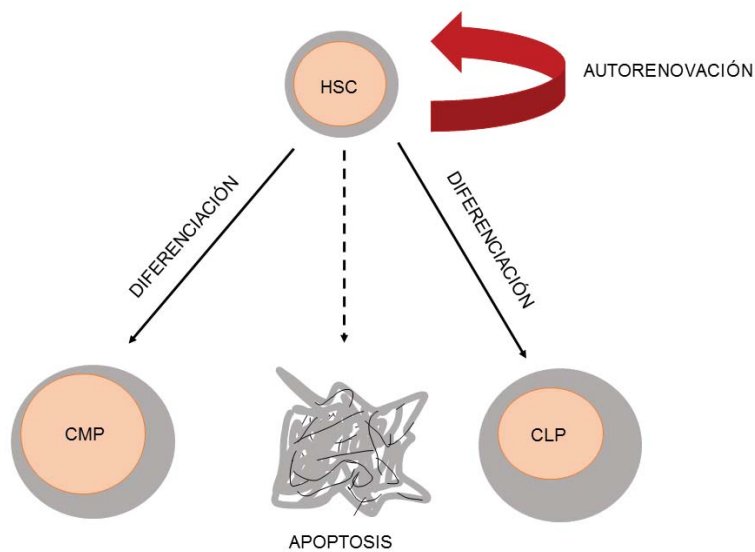


Figura 1. Esquema de los mecanismos fisiológicos de la hematopoyesis (adaptado de Zhu y col 2002 ³).

HSC: célula madre hematopoyética; CMP: progenitor mielóide común; CLP: progenitor linfóide común

La capacidad de autorrenovación de las HSC es la habilidad de generar células hijas idénticas sin diferenciarse, garantizando una formación continua de las células hematopoyéticas funcionales a lo largo de toda la vida. Dicha capacidad de autorrenovación es la característica diferencial de las HSC respecto a las células más maduras de la hematopoyesis. Las autodivisiones de las HSC pueden ser simétricas, en la cual una HSC da lugar a dos HSC idénticas, o asimétricas, en la cual una célula persiste como HSC y la otra se diferencia. Dada la capacidad de las HSC de mantener la homeostasis de la hematopoyesis, la mayoría de las divisiones de HSC dan lugar a una célula que persiste como HSC y una célula que se diferencia. Sin embargo, como respuesta a situaciones de estrés (infecciones, sangrado, tratamiento quimioterápico), las HSC pueden autodividirse en dos HSC.

Las HSC son multipotenciales, es decir, tienen la capacidad de diferenciarse y generar todos los tipos celulares funcionales de la sangre. En el desarrollo hematopoyético, la multipotencialidad se va restringiendo progresivamente a medida que los progenitores hematopoyéticos se van diferenciando y comprometiendo hacia los diferentes linajes hematopoyéticos. A partir de la célula madre linfomieloide (CFU-LM) aparecen la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide (CFU-M). La CFU-M, estimulada por el microambiente, da lugar a otras poblaciones comprometidas hacia la diferenciación de una o varias líneas mieloides denominadas células formadoras de colonias (CFC) o unidad formadora de colonias (UFC), de las que se conocen distintos tipos: BFU-E, CFU-E para la línea eritroide, CFC-GM, para la granulomonocítica, CFC-Eo para los eosinófilos, CFC-Ba para los basófilos, y BFU-Meg y CFU-Meg para los megacariocitos (Figura 2).

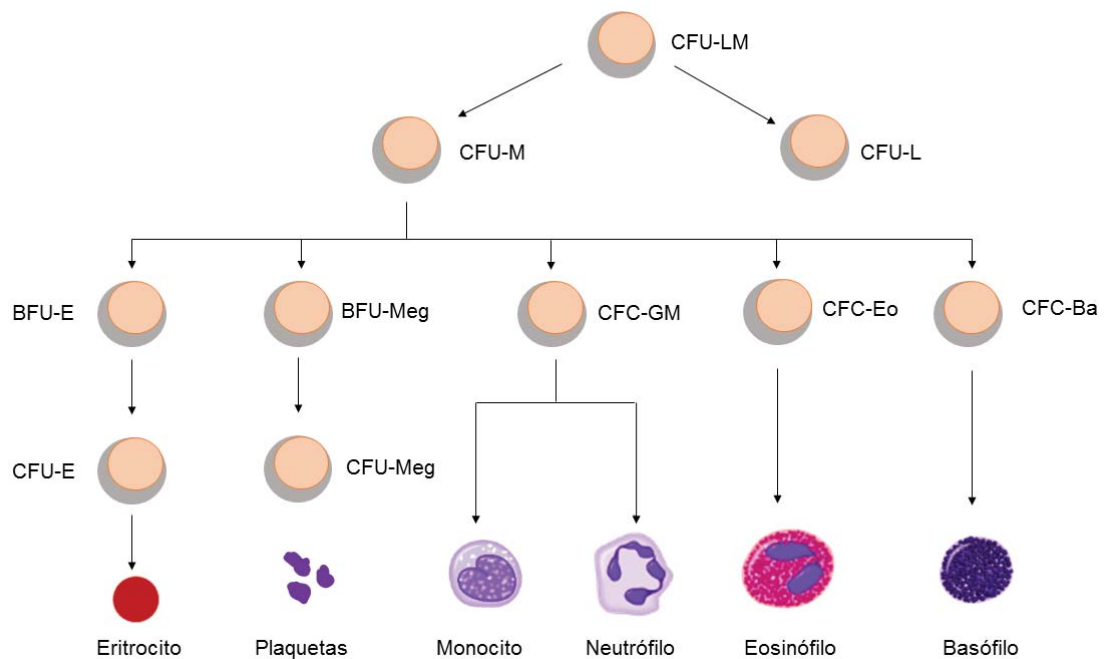


Figura 2. Esquema de la hematopoyesis humana

CFU-LM: célula madre linfomieloide; CFU-M: célula germinal mieloide; CFU-L: célula germinal linfoides; BFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; BFU-Meg: unidad formadora de colonias; CFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas; CFC-GM: unidad formadora de colonias granulocíticas-macrofágicas; CFC-Eo: unidad formadora de colonias eosinófilas; CFC-Ba: unidad formadora de colonias basófilas.

La apoptosis o muerte celular programada no es un proceso reservado únicamente a la célula madura y dañada, sino que también interviene en la regulación celular desde los niveles más inmaduros hasta los precursores más diferenciados. Este proceso es regulado por factores de supervivencia al mismo tiempo que por señales de muerte celular ⁴.

1.2. Marcadores moleculares de las células hematopoyéticas

Como se ha comentado, las células hematopoyéticas más inmaduras no poseen distintivos morfológicos que permiten diferenciarlas. A través de estudios inmunofenotípicos se pueden identificar los distintos progenitores mieloides. No existe un marcador de superficie único para este grupo de células, pero usando combinaciones de marcadores se pueden definir distintos grupos de células hematopoyéticas: HSC y células progenitoras (HPC)

El marcador más ampliamente utilizado en el aislamiento de progenitores hematopoyéticos humanos es el CD34 (ligando de la L-selectina). Esta glucoproteína de superficie se expresa en el 1-5% de células mononucleadas, incluyendo HSC y células progenitoras (HPC), en células vasculares endoteliales y en algunos fibroblastos ⁵. Se ha postulado que CD34 posee un papel importante en la adhesión/localización de las HSC y HPC en la médula ósea ⁶⁻¹³. Las células CD34+ tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis humana y tradicionalmente se ha considerado un marcador de HSC y clínicamente se usa para cuantificar las células trasplantables. La diferenciación de las células madre hematopoyéticas va asociada a la pérdida de CD34 y al inicio de la expresión de otros antígenos característicos de estadios de diferenciación más avanzados. Los ensayos *in vitro* revelaron que la población de células CD34+ era muy heterogénea. Así, se inició la búsqueda de nuevos marcadores de superficie que permitieran mejorar la identificación de poblaciones enriquecidas en HSC. Algunas de las moléculas identificadas fueron HLA-DR ¹⁴, CD45RA ¹⁵, CD90 ^{16,17} y CD38 ^{18,19}, en las diferentes fuentes de progenitores hematopoyéticos analizadas (médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica movilizada).

CD38 es un marcador importante en la caracterización de las células hematopoyéticas. La mayoría de las células CD34+ coexpresan el marcador CD38. La población CD34+CD38- está muy enriquecida en células con capacidad de reconstitución de los modelos murinos NOD/SCID ¹⁹. En cambio, las células CD34+CD38+ dan lugar a una reconstitución temprana y transitoria cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes ²⁰. Se definen las HSC y HPC como CD34+CD38- y CD34+CD38+, respectivamente.

Las HSC y HPC no expresan un conjunto de marcadores asociados con la diferenciación final de tipos celulares. La no expresión de estos marcadores de linaje (Lin-) puede ser utilizada para diferenciar las células inmaduras de las células más diferenciadas. Majeti y *col* han demostrado que las células Lin-CD34+CD38- pueden dividirse en 3 sub-poblaciones de acuerdo con la expresión de CD90 y CD45: CD90+CD45RA-, CD90-CD45RA- y CD90-CD45RA+. Utilizando modelos murinos y ensayos *in vitro*, han identificado que

la población con el fenotipo Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- es la que contiene a las células HSC humanas ²¹.

1.3. Regulación de la hematopoyesis

En el adulto, la hematopoyesis, en condiciones normales, sólo se desarrolla en la médula ósea y está regulada por varios mecanismos como la interacción de las células entre sí, la interacción con su microambiente, con factores de crecimiento y factores inhibitorios y con la matriz extracelular.

1.3.1. Microambiente medular y *stem cells*

La médula ósea constituye el microambiente ideal (nicho) para la supervivencia de las *stem cells*, su autorrenovación y su diferenciación hacia células maduras. Está formada por células estromales y una red microvascular (Figura 3).

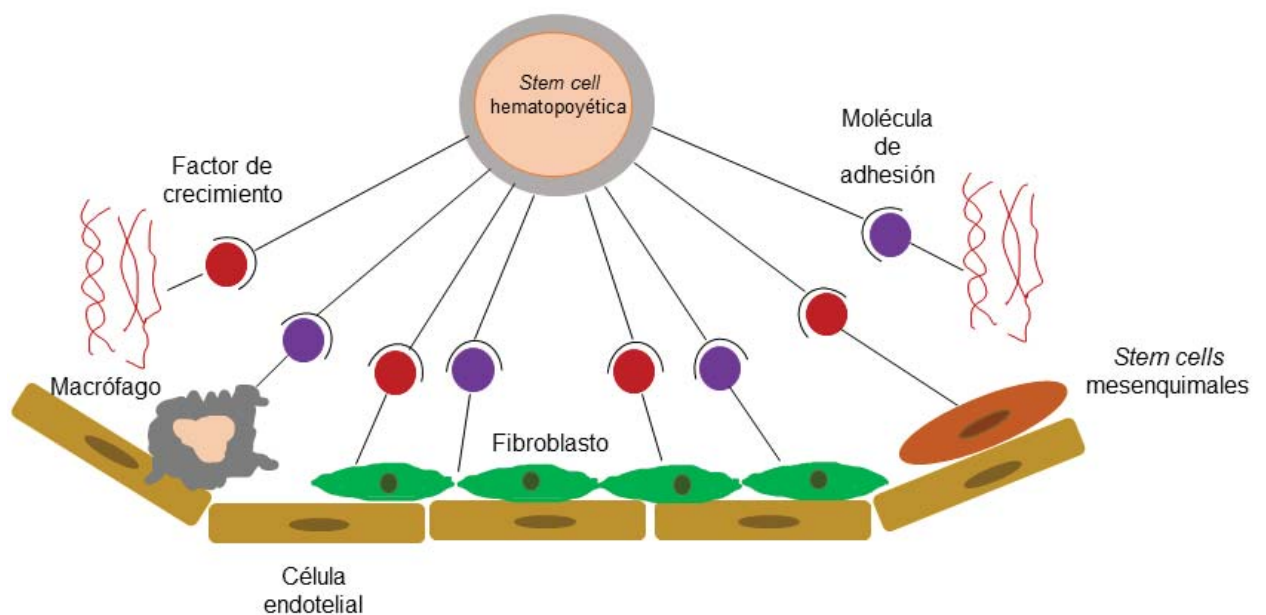


Figura 3. Esquema de la interacción entre las células *stem cell* hematopoyéticas y el microambiente de la médula ósea (Adaptado de *Hoffbrand's Essential Haematology* ²²)

Las células estromales incluyen las *stem cells* mesenquimales, que producen fibroblastos, adipocitos y osteoblastos, las células endoteliales y los macrófagos. Las células del estroma celular segregan unos componentes que participan en la formación de la matriz extracelular: fibronectina, colágeno, glicoproteínas y glicosaminoglicanos, entre los más representativos. Algunos de estos componentes, como la fibronectina, proporcionan el sustrato esencial al que se adhieren los progenitores mieloides y eritroides durante su desarrollo. Asimismo, dichas células estromales también segregan los factores de crecimientos necesarios para la supervivencia de las *stem cells*.

Los progenitores y los precursores hematopoyéticos, para migrar de la médula ósea, pasan a través de la barrera endotelial de los sinusoides, proceso esencialmente regulado a través de la interacción entre las células CD34+ y las moléculas de adhesión endoteliales e integrinas que expresan las células endoteliales, y también por factores de crecimiento angiogénicos.

1.3.2. Factores de crecimiento y factores inhibitorios

Los factores de crecimiento son glicoproteínas que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y maduración de las HSC, así como en la inhibición de la apoptosis. Además, se unen a la matriz extracelular para formar nichos a los que se adhieren las HSC.

Entre los factores de crecimiento destacan la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO), los factores estimulantes de colonias (FEC) y las interleucinas (IL) (Figura 4). Tradicionalmente se había considerado que alguno de estos factores tenía una acción específica restringida a una línea celular; sin embargo, se ha comprobado que la mayoría de ellos actúan sinérgicamente en la diferenciación de distintas líneas celulares, tal y como se puede observar en la figura 4 ²³⁻²⁵.

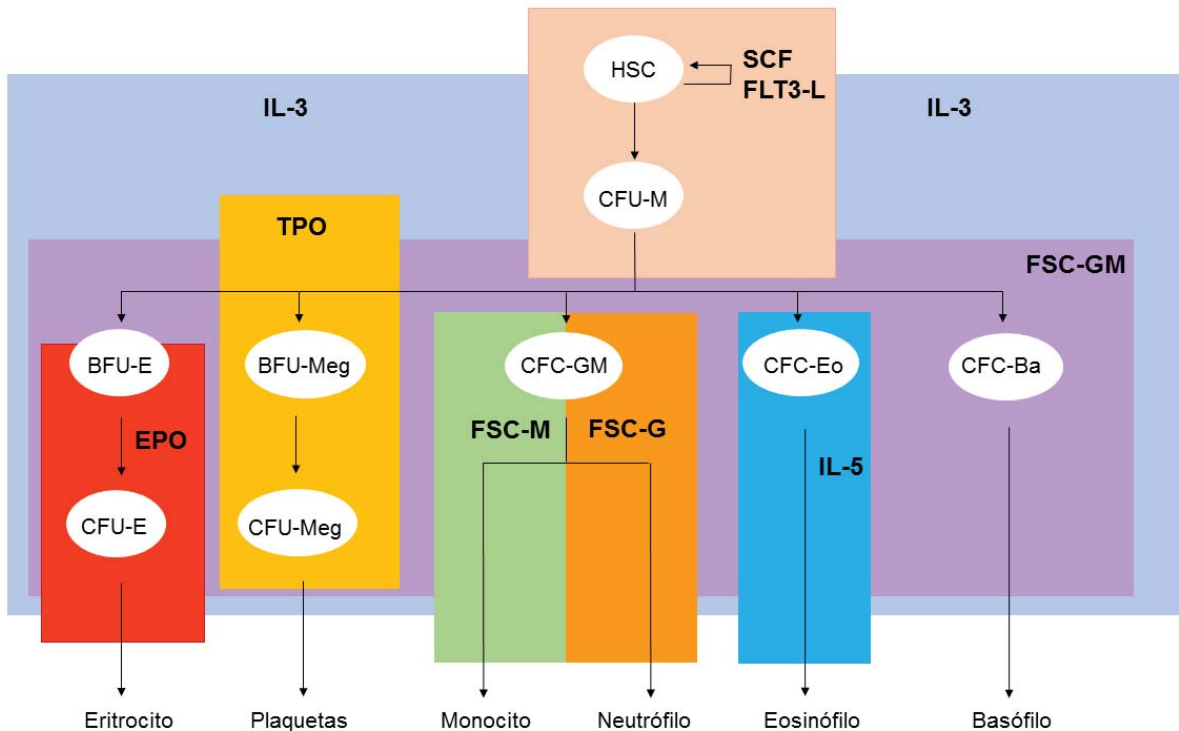


Figura 4. Esquema de la función de los factores de crecimiento en la hematopoyesis normal (Adaptado de Hoffbrand's Essential Haematology ²²)

HSC: célula madre hematopoyética; CFU-M: célula germinal mieloide; BFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; BFU-Meg: unidad formadora de colonias; CFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas; CFC-GM: unidad formadora de colonias granulocíticas-macrofágicas; CFC-Eo: unidad formadora de colonias eosinófilicas; CFC-Ba: unidad formadora de colonias basófilas SCF: factor de células madre; FLT3-L: ligando FLT3; IL-3: interleucina 3; EPO: eritropoyetina; TPO: trombopoyetina; FSC-GM: factor estimulante de colonias granulomonocíticas; FSC-M: factor estimulante de colonias monocíticas; FSC-G: factor estimulante de colonias granulocíticas; IL-5: interleucina 5.

Por otra parte, existen los factores inhibitorios de la hematopoyesis, que ejercen un efecto inhibitorio de la fase mitótica celular. La proteína inflamatoria del macrófago (MIP-1 α), producida por los macrófagos, tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las *stem cells*, evitando que entren en fase S del ciclo celular ²⁶. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β), por su parte, inhibe la proliferación de progenitores precoces, aunque además tiene capacidad estimuladora del crecimiento de progenitores maduros ²⁷. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) también potencia la acción proliferativa de la IL-3 y el GM-CSF y, por otra parte, ejerce una acción inhibitoria en distintos progenitores hematopoyéticos ²⁸.

2. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

2.1. Introducción

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son enfermedades clonales de la célula madre hematopoyética caracterizadas por la proliferación de células maduras de una o varias líneas mieloides y que comparten ciertas características clínicas y biológicas como son la presencia de una médula ósea hiper celular, esplenomegalia, una incidencia aumentada de complicaciones trombóticas y hemorrágicas y riesgo de progresión a mielofibrosis y, a largo plazo, a leucemia aguda (LA) ²⁹.

De acuerdo con la clasificación actual de la OMS ³⁰, las NMP incluyen las siguientes entidades: leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia neutrofílica crónica (LNC), policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria (MFP), trombocitemia esencial (TE), leucemia eosinofílica crónica (LEC) y las neoplasias mieloproliferativas inclasificables.

Tabla 1. Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016 ³⁰.

Leucemia mieloide crónica (LMC)

Leucemia neutrofílica crónica (LNC)

Policitemia vera (PV)

Mielofibrosis primaria (MFP)

 Mielofibrosis primaria prefibrótica

 Mielofibrosis primaria, fase fibrótica establecida

Trombocitemia esencial (TE)

Leucemia eosinofílica crónica (LEC)

Neoplasias mieloproliferativas inclasificables

El concepto de NMP fue propuesto en 1951 por William Dameshek, quien 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 ³¹. Así, en aquel momento se especulaba que un esteroide u otra hormona pudieran actuar como factor estimulador de la mielopoyesis. El aumento de la masa eritrocitaria en la PV, la trombocitosis en la TE y la fibrosis medular en la MFP son, respectivamente, las características fundamentales de cada una de estas tres entidades, consideradas en conjunto como NMP cromosoma Philadelphia negativas (Ph -) clásicas. Posteriormente, en 1974, se describió que los progenitores eritroides de la médula ósea de pacientes con PV podían cultivarse *in vitro* en ausencia de EPO ³², hallazgo que contrastaba con el hecho de que en individuos normales el crecimiento de progenitores hematopoyéticos se producía únicamente en presencia de factores de crecimiento. Este hallazgo podría explicarse por la presencia de valores elevados de proteína Bcl-xL, inhibidora de la apoptosis, en las colonias EPO-independientes y, por el contrario, valores muy disminuidos o ausentes de dicha proteína en las colonias eritroides de sujetos normales o afectados de eritrocitosis secundarias ³³. Dicho descubrimiento sugería un comportamiento neoplásico de las NMP y, por tanto, un origen clonal de la enfermedad. Este origen clonal se confirmó más tarde por Adamson y Fialkow que demostraron que los hematíes, los granulocitos y las plaquetas de mujeres con PV tenían la misma isoenzima de la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasas (G6PD) y, como consecuencia, el mismo patrón de inactivación del cromosoma X (PICX), lo cual indicaba que se originaban a partir de un progenitor hematopoyético clonal ³⁴. Sin embargo, las alteraciones genéticas implicadas en la patogenia de la PV no se empezaron a conocer hasta que recientemente Kralovics y *col* refirieron que el 33% de los pacientes con PV presentaban una pérdida de la heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 9, debido a un mecanismo de recombinación mitótica, por tanto, no reconocible en el estudio citogenético convencional ³⁵. Finalmente, en el año 2005 cinco grupos independientes demostraron de forma simultánea la mutación p.V617F del gen *JAK2*, localizado en el cromosoma 9, presente en el 95% de los pacientes con PV y en la mitad de los casos de TE y MFP ³⁶⁻⁴⁰. Posteriormente a la

descripción de la mutación V617F, Scott y *col* demostraron mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2* en los pacientes con PV V617F negativos ⁴¹. Más recientemente, se han descrito mutaciones que afectan al gen *MPL*, que codifica para el receptor de la trombopoyetina y mutaciones en el gen de la calreticulina (*CALR*) ⁴²⁻⁴⁴. Todas ellas, junto a las mutaciones del gen *JAK2*, constituyen mutaciones denominadas *driver* o conductoras de las NMP. Adicionalmente, existen otras mutaciones somáticas que no actúan primariamente en la proliferación celular, pero que pueden modificar el efecto de las mutaciones *driver*. Estos genes pertenecen a distintas categorías y funciones como reguladores epigenéticos, factores de transcripción o moléculas de vías de señalización y se describen en el apartado 2.5.

2.2. Neoplasias mieloproliferativas con mutación de *JAK2*

2.2.1. Gen *JAK2*

JAK2, junto con *JAK1*, *JAK3* y *TYK2*, es una tirosina cinasa que pertenece a la familia de las *Janus cinasas* (*JAKs*) y que está codificada por el gen *JAK2* localizado en el cromosoma 9p24 ⁴⁵.

Todas las proteínas *JAKs* comparten la misma estructura, con siete regiones conocidas como dominios de homología de *JAK* (*JH*). La estructura de los distintos dominios funcionales consiste en un dominio N-terminal *FERM* (*JH4-JH7*), un dominio *Src homolgy-2 (SH2)-like* (*JH3-JH4*), un dominio pseudocinasa (*JH2*) y un dominio tirosina cinasa en C-terminal (*JH1*) (Figura 5).

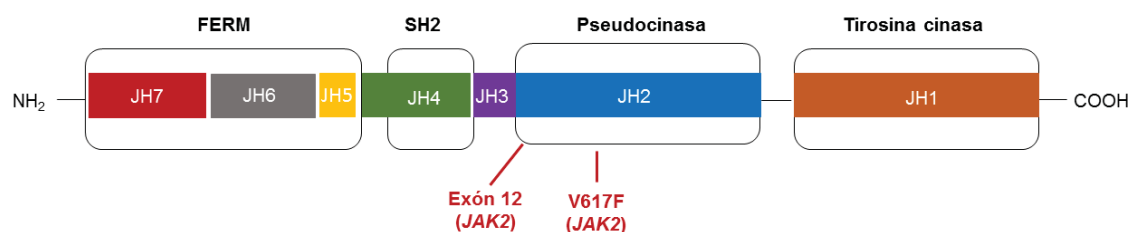


Figura 5. Esquema de la estructura de la proteína *JAK2* y localización de las principales mutaciones descritas

El dominio FERM es el responsable de la asociación de las proteínas JAK con los receptores de las citosinas. El dominio *SH2-like* no parece tener la función convencional de un dominio de unión a fosfotirasa y su función exacta aún está por determinar. El dominio cinasa (JH1) se activa vía trasfosforilación de tirosinas en tándem localizadas en el *loop* de activación. Finalmente, el dominio JH2 es un dominio pseudocinasa y su principal función es regular negativamente el dominio JH1 ^{46,47}. Dado que la mayoría de mutaciones se encuentran en el dominio pseudocinasa, se sugiere que actúan disminuyendo el efecto inhibitorio de este dominio.

La proteína JAK2 está implicada en vías de señalización activadas desde los receptores de citosinas tipo I, entre los que se encuentran los receptores de las interleucinas IL3, IL5, la EPO, el G-CSF, el GM-CSF o la TPO (c-MPL) ⁴⁸. En condiciones normales, al unirse el ligando al receptor, éste se dimeriza, de forma que las dos moléculas de JAK2 unidas al dominio yuxtamembrana citoplasmático del receptor se aproximan y se activan mutuamente por fosforilación ^{49,50}. Una vez activada, JAK2 puede fosforilar residuos tirosina de otras proteínas, entre las que se encuentran los factores de transcripción STAT (*Signal transducer and activator of transcription*; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) y proteínas implicadas en otras vías de transducción de señales (MAPK y PI3K) ^{51,52} (Figura 6).

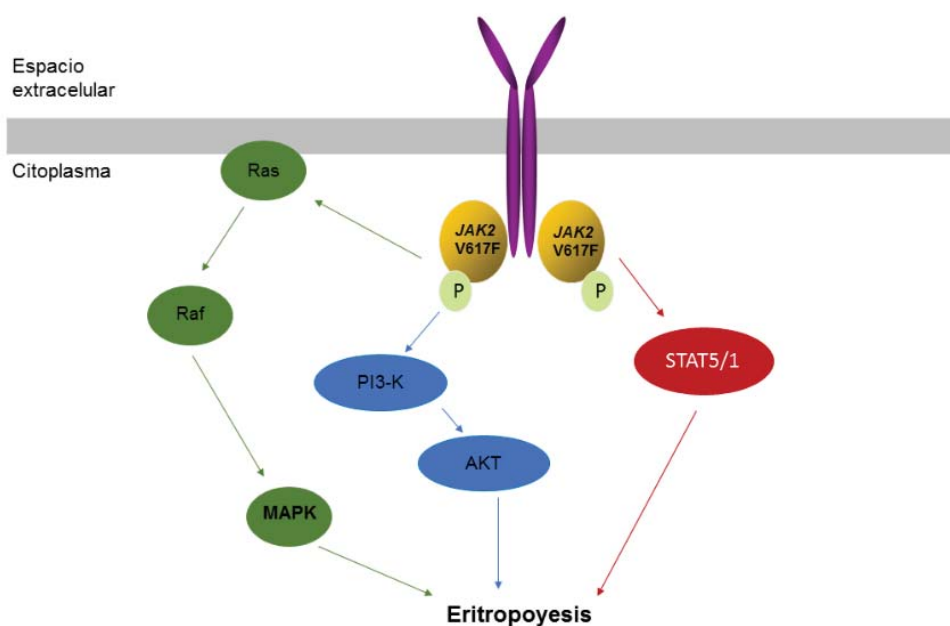


Figura 6. Esquema de las vías de señalización de la proteína JAK2

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. Por estos motivos, las alteraciones en esta vía pueden tener un papel importante en el desarrollo de las NMP.

2.2.2. Mutación *JAK2V617F*

En el año 2005, cinco grupos independientes describieron la mutación V617F en el gen *JAK2* en pacientes con NMP³⁶⁻⁴⁰. La mutación *JAK2V617F* es una mutación puntual que resulta del cambio de una guanina por una timidina en la posición 1849 localizada en el exón 14 del gen *JAK2* que supone un cambio de valina (V) por fenilalanina (F) en el aminoácido 617. Este aminoácido se localiza en el dominio pseudocinasa JH2 de la proteína JAK2 que tiene actividad inhibitoria sobre el dominio cinasa interaccionando con el bucle de activación⁴⁷. Como consecuencia de la mutación V617F, 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, G-CSF, c-MPL) como JAK-STAT, PI3K, AKT, MAPK y ERK^{36,39,40,53-55}.

La mutación *JAK2V617F* se detecta en más del 95% de los pacientes con PV y en el 50-60% de los pacientes con TE y MFP. Asimismo, puede estar presente en otras neoplasias mieloides, como sucede en el 60% de pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (RARS-T)⁵⁶. El estado mutacional se denomina de forma convencional heterocigoto cuando un solo alelo está mutado u homocigoto cuando los dos alelos están mutados por un proceso de recombinación mitótica³⁸. No obstante, esta terminología no deja de ser algo inexacta cuando se aplica a la valoración de la carga mutacional, pues se ha observado que en pacientes con PV categorizados como heterocigotos, el análisis de las colonias hematopoyéticas demuestra que

muchos pacientes presentan una mezcla de células homocigotas y heterocigotas ⁵⁷.

2.2.3. Hematopoyesis de las NMP *JAK2* mutadas

La importancia de *JAK2* en la hematopoyesis se puso de manifiesto en un modelo murino *knock-out* en el que se eliminó dicho gen. Estos ratones presentaron una ausencia total de progenitores eritropoyéticos y todos ellos murieron en el día 12 del desarrollo embrionario ^{48,58}.

La mutación V617F de *JAK2* se ha detectado tanto en progenitores hematopoyéticos obtenidos de cultivos de colonias eritroides, granulomonocíticas y megacariocíticas *in vitro* ^{37,59,60}, como en células CD34+CD38- aisladas mediante *sorting* ⁶¹, así como en células progenitoras mieloides y, en algunos estudios, en células de estirpe linfoide ⁶¹⁻⁶³. Este hallazgo apoya que las NMP tienen su origen en una célula madre hematopoyética multipotente y explicaría la frecuente existencia de leucocitosis y trombocitosis en las NMP.

La hematopoyesis de las NMP *JAK2* positivas se caracteriza por una coexistencia de progenitores mutados y de progenitores normales. En los pacientes con TE y PV, el porcentaje de progenitores mutados constituye una minoría de la hematopoyesis total, y en la TE éstos pueden permanecer estables en el tiempo ^{64,65}. Este hallazgo sugiere que la mutación V617F de *JAK2* confiere una ventaja proliferativa débil a nivel de progenitores ⁶¹. Por otra parte, en un estudio con 41 pacientes con NMP *JAK2* positivas se demostró que el compartimento de células CD34+CD38- con mutación *JAK2*V617F en los pacientes con PV y TE no se expandía durante la evolución de la enfermedad, hallazgo que sí se observó en la MF ⁶⁶. En la misma línea, dos trabajos recientes han analizado la supresión de la hematopoyesis normal por el clon *JAK2*V617F en los pacientes con NMP, y para ello definieron el concepto de dominancia clonal como una diferencia de la carga mutacional de *JAK2*V617F entre granulocitos y células CD34+ igual o inferior al 10%. En ambas series se demostró que dicha dominancia clonal, y por tanto, una supresión de la hematopoyesis normal, estaba significativamente asociada al

fenotipo de MF, pero no a PV ni TE ^{67,68}. Adicionalmente, y usando modelos murinos, dos grupos independientes, demostraron un pobre injerto de células CD34+ *JAK2V617F* de pacientes con TE y PV en ratones NOD/SCID (*non-obese diabetic-severe combined immunodeficient*) ^{69,70}. Por último, la descripción de la presencia de la mutación *JAK2V617F* en un pequeño porcentaje de individuos sanos también sugiere que dicha mutación no confiere una importante ventaja proliferativa ⁷¹⁻⁷³, aunque en un estudio poblacional danés, la cantidad de mutación detectada se correlacionó con mayor riesgo de desarrollo de una NMP ⁷⁴.

Recientemente, algunos estudios basados en modelos murinos *knock-in*, apoyarían que la mutación *JAK2V617F* sí que podría ejercer una ventaja proliferativa a nivel progenitor en la hematopoyesis de las NMP. Así, Mullally y *col*, siguieron ratones trasplantados durante más de un año y observaron que las células HSC *JAK2V617F* adquirirían gradualmente ventaja proliferativa respecto las no mutadas. Resultados similares fueron descritos de forma independiente por otro grupo ^{75,76}.

Todo ello sugiere que podrían existir otros factores que jueguen un papel importante en la expansión del clon *JAK2V617F*-mutado y, por tanto, intervenir en la génesis y progresión de la PV y de la TE. Entre estos factores destaca la presencia de mutaciones en otros genes, las cuales pueden adquirirse antes o después de *JAK2V617F*. Así, se ha descrito que la mutación *JAK2V617F* en casos familiares es adquirida y, por tanto, la predisposición heredada es independiente de *JAK2* ⁷⁷. En segundo lugar, en estudios de PICX, se ha descrito un porcentaje superior de granulocitos clonales detectados por esta técnica que granulocitos con mutación *JAK2V617F*, sugiriendo que existiría una proliferación clonal previa a la adquisición de la mutación V617F de *JAK2* ⁷⁸. Adicionalmente, el hecho de que en algunos pacientes con LA post-PV y post-TE las células leucémicas sean *JAK2* no mutadas, sugiere que la LA se ha originado a partir de un clon previo a la adquisición de *JAK2V617F* ^{78,79}. Por último, dado que tanto el porcentaje de casos con mutaciones adicionales como el número de mutaciones por paciente es mayor en la MF que en la PV o TE, podría especularse que la presencia de mutaciones adicionales favoreciera el desarrollo de la dominancia clonal, habitualmente observada en la MF ^{67,68}.

Existe por tanto evidencia de que la presencia de mutaciones adicionales a *JAK2V617F* puede influir en la hematopoyesis de las NMP. No obstante, el orden de adquisición de las mismas probablemente también juegue un papel importante. En este sentido, y como ya se ha comentado anteriormente, Ortmann y *col*, han obtenido y genotipado más de 4000 colonias de 24 pacientes con NMP *JAK2/TET2* mutadas, demostrando que en los pacientes *TET2-first* (aquellos que adquirieron primero la mutación en *TET2*), las colonias *TET2* mutadas favorecen la expansión clonal, pero la diferenciación hacia células megacariocíticas o eritroides no se activa hasta la adquisición de *JAK2V617F*. Por el contrario, en los pacientes *JAK2-first*, las colonias *JAK2* mutadas no se expanden hasta la adquisición de *TET2*, pero sí que presentan una alta capacidad de diferenciarse a células más maduras ⁸⁰. El papel de las mutaciones adicionales en la hematopoyesis de las NMP se amplía en un apartado posterior.

No obstante, en el 52% y 38% de pacientes con TE y PV *JAK2V617F*, respectivamente, no se ha podido demostrar la presencia de mutaciones adicionales ⁸¹. Este hallazgo sugiere que la mutación *JAK2V617F* podría ser suficiente para el desarrollo de la NMP o bien que existen otros factores a nivel progenitor que podrían influir en el desarrollo de dichas NMP ⁸¹. Entre ellos destaca el microambiente a nivel del nicho medular (participación de IL-1 β , FLT3L, IL-33 ⁸²⁻⁸⁴), el efecto del tratamiento, y variantes genéticas constitucionales (SNPs en *TERT*, *MECOM* y *JAK2* o 46/1 ⁸⁵).

2.2.3.1. Modelos murinos

Desde el descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*, han sido muchos los grupos que han creado modelos murinos en los cuales se ha introducido dicha mutación con el objetivo de evaluar las consecuencias de ésta *in vivo* y dilucidar los mecanismos que participan en el inicio y la progresión de las NMP.

Modelos retrovirales

Inmediatamente después de la descripción en 2005 de *JAK2V617F*, varios grupos generaron modelos murinos retrovirales para discernir el efecto a

nivel fenotípico de *JAK2V617F in vivo* ^{36,86–89}. Observaron que los ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos portadores de la mutación *JAK2V617F* desarrollaban un cuadro clínico tipo NMP con muchas características de PV, incluyendo eritrocitosis, esplenomegalia y hematopoyesis extramedular ^{36,86–89}, y meses después del trasplante, algunos ratones evolucionaban a un cuadro clínico compatible con MF post-PV. Estudios adicionales realizados en estos ratones evidenciaron una activación constitutiva de JAK2 y una fosforilación de STAT5, junto con una formación de colonias independiente de citocinas. Estos modelos describieron por primera vez que la expresión de *JAK2V617F in vivo* es suficiente para inducir el desarrollo de un fenotipo de NMP ^{36,86–89}.

Modelos transgénicos

Posteriormente a los estudios iniciales basados en modelos retrovirales, tres grupos generaron modelos murinos transgénicos en 2008 con el objetivo de correlacionar el fenotipo con la carga mutacional de *JAK2V617F* ^{90–92}. Observaron que el nivel de expresión de *JAK2V617F* influía en el fenotipo de NMP: mientras que los ratones con baja expresión de *JAK2V617F* desarrollaban un fenotipo TE-*like*, los que expresaban *JAK2V617F* de forma más intensa daban lugar a un fenotipo más próximo a PV.

Modelos de xenotrasplante

Estos modelos murinos se desarrollaron con el objetivo de estudiar la funcionalidad de *JAK2V617F* en las células más inmaduras de la hematopoyesis. Xu y *col*, obtuvieron células periféricas CD34+ de pacientes con MF y observaron que éstas injertaban en ratones NOD/SCID y pudieron demostrar hematopoyesis clonal con diferenciación mieloide ⁹³. Posteriormente, y de forma similar, se ha demostrado que las células CD34+, en este caso esplénicas, de pacientes con MF también tenían la capacidad de injertar en ratones NOD/SCID/IL2R γ -null y que podían ser trasplantadas en segundos receptores ⁹⁴. En cambio, las células CD34+ de pacientes con PV y TE presentaban una pobre capacidad de injertar ⁶⁹. Este hallazgo sería consistente con una mayor *ratio* de *JAK2V617F/JAK2* no mutado en las células trasplantadas obtenidas de pacientes con MF en comparación con la PV y

TE⁷⁰. Por otro lado, la ausencia de injerto en ratones trasplantados con células de PV y TE sugiere que la mutación *JAK2V617F* no presenta una ventaja proliferativa sobre las células *JAK2* no mutadas ⁷⁰. De nuevo, la presencia de mutaciones adicionales podría influir en la alta capacidad de injertar de las células de pacientes con MF. En este sentido, se ha demostrado que las células CD34+ portadoras de mutaciones en *TET2* y *JAK2* presentan más capacidad de repoblar ratones NOD/SCID respecto las células únicamente con mutación *JAK2V167F* ⁹⁵.

Un aspecto a considerar en la interpretación de estos resultados es el hecho de que los xenotrasplantes se basan en trasplantes entre diferentes especies y, como consecuencia, las incompatibilidades entre los receptores de citocinas humanas (expresadas en las células CD34+ trasplantadas) y las citocinas murinas (expresadas en el receptor) pueden interferir y activar vías de señalización. En este sentido, estos modelos de xenotrasplante en NMP precisan de procesos adicionales de optimización.

Modelos Knock-in (KI)

A partir de 2010 diferentes grupos desarrollaron modelos murinos knock-in que han permitido expresar *JAK2V617F* a partir de un promotor endógeno *JAK2*. En la tabla resumen que se muestra a continuación se resumen las principales características de los modelos de Akada y col ⁹⁶, Marty y col ⁹⁷, Mullally y col ^{75,98}, Li y col ^{99,100} y Hasan y col ⁷⁶.

Tabla 2. Resumen de los modelos murinos *knock-in JAK2V617F*

Ref	Origen JAK2	Tipo	Expresión VF: WT	Homocigosis	Fenotipo	Mielofibrosis	Efecto de en células HSC y HPC	Función en las HSC
Akada 2010 ⁹⁶	Ratón	Condicional	< 1:1	Sí	PV- <i>like</i>	Sí	↑ LSK y MEP	ND
Marty 2010 ⁹⁷	Ratón	Constitutivo	~ 1:1	No	PV- <i>like</i>	Sí	ND	ND
Mullally 2010 ⁹⁸	Ratón	Condicional	< 1:1	No	PV- <i>like</i>	Sí	No ↑ LSK Sí ↑ MEP	Ventaja proliferativa débil (16 semanas)
Li 2010 ⁹⁹	Humano	Condicional	~ 1:1	No	TE- <i>like</i>	No	↓ LSK	Pérdida de función
Mullally 2012 ⁷⁵	Ratón	Condicional	~ 1:1	No	PV- <i>like</i>	Sí	ND	Ventaja proliferativa (1año)
Hasan 2013 ⁷⁶	Ratón	Condicional	~ 1:1	No	PV- <i>like</i>	Sí	↑ LSK ↑ progenitores mieloides	Ventaja proliferativa intensa
Li 2014 ¹⁰⁰	Ratón	Condicional	~ 1:1	Sí	TE > PV- <i>like</i>	No	No ↑ LSK Sí ↑ MEP	Homocigosis es insuficiente para la expansión clonal

LSK: Lin-Sca1+c-kit+ (contiene las HSC); MEP: progenitores eritroides y megacariocítico; ND: no disponible

Los primeros modelos murinos KI publicados en 2010 se generaron con el principal objetivo de evaluar los efectos de *JAK2V617F* a nivel de las HSC. El fenotipo de los tres modelos que expresan *JAK2V617F* murino es similar⁹⁶⁻⁹⁸. En cada uno de estos modelos, los ratones que expresaban *JAK2V617F* en forma heterocigota desarrollaron un fenotipo *PV-like*, con eritrocitosis, leucocitosis, esplenomegalia secundaria a hematopoyesis extramedular y mielofibrosis, sugiriendo que la expresión heterocigota de *JAK2V617F* es suficiente para el desarrollo de PV. Comparado con los tres modelos anteriores, los ratones generados por Li y *col* expresaron un fenotipo más *TE-like*⁹⁹. Esto puede verse influenciado por el hecho de que en este modelo se expresa *JAK2V617F* de origen humano y se desconoce si las vías de expresión de *JAK2* humana en los ratones puede ser diferente.

En el modelo de Akada y *col* se avaluó la expresión homocigota de *JAK2V617F*, que de forma similar a la expresión heterocigota, resultó en un fenotipo *PV-like*. No obstante, la expresión homocigota se asoció a un incremento significativo de reticulocitos, leucocitos, neutrófilos y plaquetas, pero sin diferencias significativas en los niveles de hemoglobina. Asimismo, se observó una esplenomegalia significativamente más pronunciada y, en la médula ósea, una mielofibrosis más intensa (grado 2) en comparación con los ratones heterocigotos, con una disminución de la celularidad medular, sugiriendo que la homocigosidad de *JAK2V617F* acelera la progresión de PV a MF post-PV⁹⁶. Otro modelo murino KI también evaluó las consecuencias de la homocigosidad de *JAK2V617F*, pero con resultados diferentes. En este caso, los ratones presentaron aumento de la hemoglobina y disminución de la cifra de las plaquetas, con un cambio de fenotipo de TE a PV¹⁰⁰. La explicación de las diferencias observadas en el fenotipo de los ratones homocigotos entre los modelos KI de Akada y *col* y Li y *col* no se conoce, pero podría deberse a diferencias metodológicas.

En todos los modelos descritos, la NMP era trasplantable a un segundo receptor, sugiriendo que las células CD34+ *JAK2* mutadas poseen una ventaja clonal respecto las células no mutadas. No obstante, es interesante destacar diferencias entre los diferentes estudios. Mientras que en los ratones del primer estudio de Mullally y *col* la mutación *JAK2V617F* confería una ventaja

proliferativa débil a las 16 semanas, el otro estudio del mismo grupo pero con un seguimiento post trasplante de 1 año, las células HSC *JAK2* mutadas adquirirían de forma gradual una ventaja proliferativa más intensa ^{75,98}. Finalmente, Hasan y *col* objetivaron una ventaja proliferativa intensa de las HSC *JAK2V617F* en los ratones ⁷⁶. El papel de células más comprometidas en la hematopoyesis fue estudiado por Mullally y *col* ^{75,98}. Seleccionaron células progenitoras megacariocíticas y eritroides y observaron que éstas eran incapaces de inducir NMP en ratones.

Todos estos resultados sugieren que la mutación V617F de *JAK2* confiere ventaja proliferativa (débil o intensa) a nivel de las HSC, pero no a los progenitores comprometidos. Por otro lado, la participación de otras alteraciones genéticas y moleculares podría intervenir en la expansión clonal de las NMP *JAK2* mutadas.

2.2.4. Factores que intervienen en el desarrollo del fenotipo de NMP *JAK2*

La mutación *JAK2V617F* se asocia a un amplio espectro de fenotipos de NMP, que incluyen la TE, PV y MF. En este sentido, se ha postulado que la PV y TE *JAK2* mutadas representan un espectro biológico de una misma enfermedad modulada por varios factores genéticos y adquiridos y la MF sería un evento tardío ¹⁰¹.

Entre los factores que se postula que pueden influir en el fenotipo de la NMP *JAK2* mutada destacan los siguientes (Figura 7):

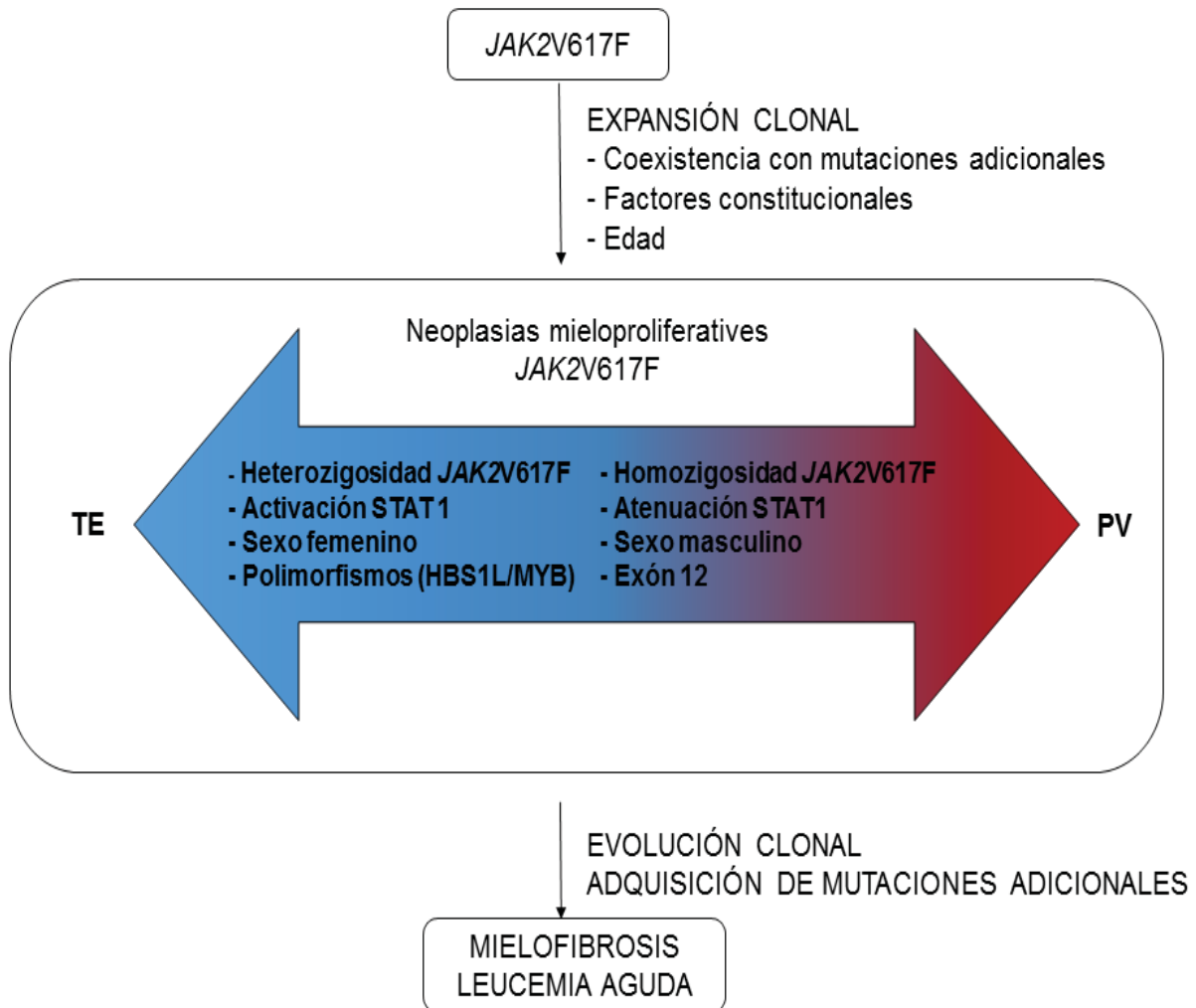


Figura 7. Factores que influyen en el fenotipo de las NMP *JAK2V617F* (adaptado de Nangalia y *col* 2016 ¹⁰²)

TE: trombocitemia esencial; PV: policitemia vera; *STAT1*: *Signal Transducer and Activator of Transcription*.

a) Homocigosidad de *JAK2V617F*: La pérdida de heterocigosidad de 9p24 (9pLOH) es un proceso en el cual, mayoritariamente por recombinación mitótica, aparecen células con dos copias de la mutación *JAK2V617F* y, como consecuencia, la carga mutacional de *JAK2V617F* de estas células es el doble de la que se cuantificaría si la mutación se encontrase sólo en estado heterocigoto (Figura 8). Por ello, generalmente los pacientes en los que existe una proporción importante de células con 9pLOH suelen tener una carga mutacional en granulocitos > 50% ¹⁰³. Aproximadamente el 30%

de pacientes con NMP presentan 9pLOH en el *locus* de *JAK2*, siendo más frecuente en la MF y PV que en la TE ³⁶⁻³⁹.

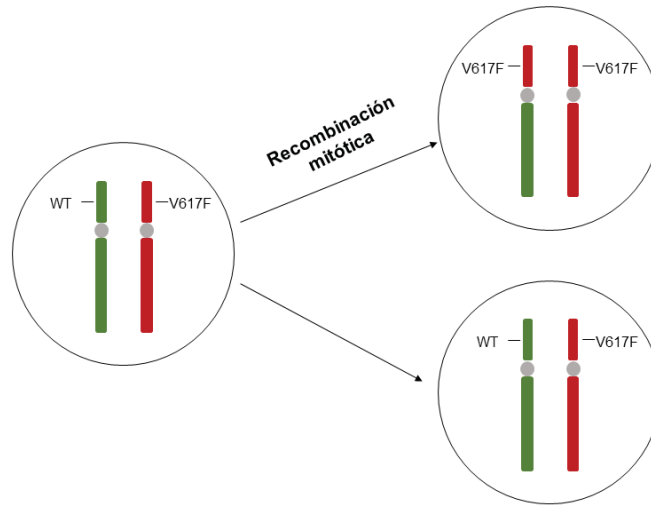


Figura 8. Representación del mecanismo de recombinación mitótica que produce la pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 9p.

El cultivo de colonias hematopoyéticas presenta una mayor sensibilidad para la detección de homocigosis que el estudio de 9pLOH a través de PCR de microsatélites. Así, estudios *in vitro* de colonias de progenitores hematopoyéticos demostraron la presencia de colonias BFU-E *JAK2V617F* homocigotas en la mayoría de pacientes con PV y en ninguno con TE ⁵⁹, hallazgo compatible con el hecho que los pacientes con PV muestran una carga mutacional superior en sangre periférica respecto los pacientes con TE ³⁸. Más recientemente, Godfrey y *col* han descrito la presencia de colonias BFU-E *JAK2V617F* homocigotas en el 80% y 52% de los pacientes con PV y TE, respectivamente ⁵⁷. Otros autores también han reportado resultados similares demostrando la presencia de colonias BFU-E *JAK2V617F* homocigotas en 5 de 12 pacientes con TE, aunque se trata de un clon minoritario ¹⁰³. Estos resultados podrían sugerir, por tanto, que la homocigosis no es ni necesaria ni suficiente para el desarrollo de PV. Adicionalmente, mediante PCR de microsatélites, se observó que la PV se asociaba a la expansión de un clon dominante homocigoto durante la

evolución de la enfermedad, siendo éste el mecanismo responsable de la eritrocitosis en la mayoría de pacientes con PV ⁵⁷.

La proporción de homocigosis de *JAK2V617F* se ha correlacionado con un hematocrito y una leucocitosis superior, una cifra de plaquetas inferior y más esplenomegalia ^{104,105}. Estudios murinos transgénicos también han demostrado el efecto de la dosis de *JAK2V617F* en el fenotipo de la NMP. Así, los ratones con baja expresión de *JAK2V617F* desarrollaban un fenotipo *TE-like* mientras que los que presentaban alta expresión de *JAK2V617F*, un fenotipo más próximo a PV ⁹⁰. Por tanto, el estado homocigoto de *JAK2V617F* es más característico de la PV.

- b) Niveles de fosforilación de STAT 1: en un estudio reciente, Chen y *col* observaron que los niveles de fosforilación de STAT1 entre los pacientes con PV y TE era distinta. Así, en la TE, la mutación *JAK2V617F* activa las vías de señalización de STAT1 y STAT5. La activación de pSTAT1 favorece la diferenciación megacariocítica y disminuye la diferenciación eritroide. Por el contrario, en la PV, la reducción de la activación de pSTAT1, inhibe la megacariopoyesis y favorece la eritropoyesis (Figura 9). Se desconoce qué factores influyen en la diferente fosforilación de STAT1/STAT5 ¹⁰⁶.

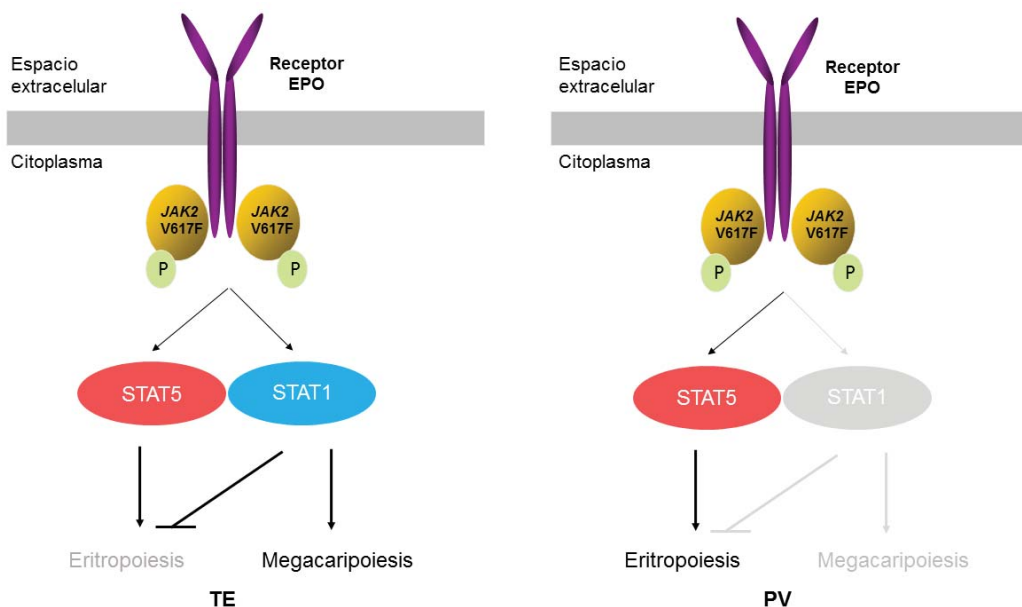


Figura 9. Mecanismo de acción de JAK2 y modelo de activación de STAT1 y STAT5 en la PV y TE (adaptado de Chen y *col* 2010 ¹⁰⁶)

- c) Sexo: la PV es más frecuente en hombres y la TE en mujeres. No existe un razonamiento claro del porqué de estas diferencias, pero se piensa que el efecto de los estrógenos y andrógenos, así como el metabolismo del hierro puedan contribuir a estas diferencias fenotípicas. En este sentido, los andrógenos podrían promover la expansión de las clonas homocigotas en los hombres e inducir el fenotipo de PV y, en cambio, el déficit de hierro en las mujeres podría inducir una restricción de la eritropoyesis, y como consecuencia, favorecer el fenotipo de TE. Esto explicaría como un mismo fenómeno genético, la homocigosidad, daría lugar a dos fenotipos. En este sentido, Godfrey y *col* han descrito que la homocigosidad ocurre por igual en ambos sexos ¹⁰⁷.
- d) Predisposición genética: se ha demostrado que la presencia del polimorfismo *HBS1L-MYB* (rs9376092) predispone al desarrollo de TE *JAK2V617F* ⁸⁵. Adicionalmente, cabe destacar que se han descrito variaciones genéticas en múltiples locus que podrían contribuir al desarrollo de la NMP, pero no con un fenotipo concreto. Así, SNPs en *TERT*, *MECOM* y *JAK2* (diferentes a 46/1) predispondrían a NMP *JAK2* no mutadas, mientras que la presencia del haplotipo 46/1 del gen *JAK2* (GGCC) predispondría al desarrollo de NMP *JAK2* mutadas, pero no a las NMP con mutación de *CALR* ^{85,108-111}.
- e) Mutaciones adicionales: en los últimos años se han identificado mutaciones adicionales en pacientes con NMP que podrían intervenir en la modulación del fenotipo y en la progresión de la enfermedad. Algunas mutaciones, como las de los genes *ASXL1*, genes implicados en el *splicing* son más frecuentes en la MFP y otras, como las que afectan *TP53* e *IDH1/2* son más prevalentes en el momento de la transformación a LA ^{43,112-115}. Por otro lado, en pacientes con PV, el truncamiento heterocigoto de *NFE2* se ha demostrado que promueve la eritrocitosis ¹¹⁶. En otro apartado se va a discutir el papel de estas mutaciones adicionales en la hematopoyesis y patogenia de las NMP.

- f) Orden de adquisición de las mutaciones: Ortmann y col, en un estudio con colonias hematopoyéticas, analizaron el orden de adquisición de *JAK2V617F* y mutaciones de *TET2* en 24 pacientes con NMP *TET2/JAK2* mutados (*JAK2*-first vs *TET2*-first). Observaron que aquellos pacientes que adquirirían *JAK2V617F* primero eran más jóvenes (60,7 años vs 71,2 años, $p=0,002$), presentaban más probabilidad de desarrollar fenotipo de PV ($p=0,05$) y, a pesar de la edad, tenían más probabilidad de presentar un evento trombótico durante el seguimiento. Así, los autores postularon que el orden de adquisición de las mutaciones puede jugar un papel en la presentación y evolución de la NMP *JAK2* mutada ⁸⁰.

2.2.5. Carga mutacional en las NMP *JAK2V617F*

Desde el descubrimiento de *JAK2V617F*, diversos estudios han correlacionado la carga mutacional de *JAK2* con características fenotípicas y evolutivas en los pacientes con NMP. Así, una alta carga mutacional de *JAK2V617F* se ha asociado con mayor frecuencia de esplenomegalia, prurito y un aumento del riesgo de complicaciones vasculares y de transformación a MF en los pacientes con PV, así como con un curso más agresivo en los pacientes con TE ^{104,105,117-120}. En la mayoría de estudios se evalúa el valor pronóstico de la carga mutacional de *JAK2V617F* en un momento determinado, ya sea en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento.

La carga alélica de *JAK2V617F* puede modificarse durante la evolución de la enfermedad como consecuencia del tratamiento o de la evolución clonal. En este sentido, se han descrito diferentes patrones evolutivos de *JAK2V617F* en los pacientes con PV y TE. En muchos pacientes, la carga mutacional de *JAK2V617F* suele permanecer estable, si bien el porcentaje de células mutadas varía mucho de unos casos a otros. Así, hay pacientes que presentan niveles bajos de granulocitos mutados (< 50%) o altos (> 50%), lo cual sugiere el predominio de células mutadas en estado heterocigoto y homocigoto, respectivamente. Por otro lado, existe otro grupo de pacientes en los que la carga alélica de *JAK2V617F* aumenta de forma progresiva durante la evolución, traduciendo una expansión clonal de la enfermedad, probablemente

como consecuencia de la adquisición de mutaciones adicionales en la clona *JAK2V617F* positiva o bien debido a la pérdida de heterocigosidad por recombinación mitótica. Por último, otros pacientes presentan un descenso progresivo de *JAK2V617F* no explicable por el tratamiento, sugiriendo, en este caso, una expansión de la clona *JAK2* negativa debido a la adquisición de mutaciones en otros genes ¹²¹.

De acuerdo con la metodología utilizada para la determinación de *JAK2V617F*, cualitativo o cuantitativo, puntual o evolutivo, se han descrito diferentes correlaciones clínicas, especialmente con la probabilidad de transformación a MF. En la tabla 3 se muestran los hallazgos de los diferentes estudios.

Tabla 3: Resumen de los estudios que correlacionan la carga mutacional de JAK2V617F con la transformación a MF

Ref	N	Metodología	Hallazgos
Tefferi 2006 ¹⁰⁴	PV = 63 (homocigoto 13, heterocigoto 45, WT 5)	Determinación puntual cualitativa	Mayor tasa de transformación a MF en los pacientes homocigotos vs heterocigotos (23% vs 2%; p=0,009)
Vannucchi 2007 ¹⁰⁵	PV= 323 (homocigoto 104, heterocigoto 219) TE= 639 (homocigoto 14, heterocigoto 368, WT 257)	Determinación puntual cualitativa	PV: Transformación a MF superior en los pacientes homocigotos vs heterocigotos (11,5% vs 1,4%; p=0.001) TE: Transformación a MF superior en los pacientes homocigotos vs WT (14,3% vs 1,6%; p=0.001) y vs heterocigotos (14,3% vs 4,7%; p=0,11)
Alvarez-Larrán 2009 ¹¹⁸	PV = 116 (homocigoto 34, heterocigoto 63, WT 5, exón12 3)	Determinación puntual cualitativa	Mayor probabilidad de transformación a MF a los 15 años en los pacientes homocigotos vs heterocigotos (55% vs 17%, p=0,04)
Passamonti 2010 ¹²⁰	PV = 338 (homocigoto 152, heterocigoto 168, WT 4, exón12 14)	Determinación puntual cuantitativa (diagnóstica 46%, evolutiva 54%)	Ocho pacientes evolucionaron a MFpPV, todos con JAK2V617F > 50%
Alvarez-Larran 2014 ¹²¹	PV = 163 TE = 184	Patrón evolutivo	Mayor riesgo de transformación a MF en los pacientes con JAK2V617F estable ≥ 50% o cambiante vs los pacientes con JAK2V617F estable < 50% (IRR: 20,7, 95% CI: 6,5-65,4; p<0.001)

N: número de pacientes; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia esencial; MF: mielofibrosis; MFpPV: mielofibrosis post PV

Se ha especulado si factores propios del individuo podrían también tener un papel en la evolución de la carga mutacional durante la evolución de la enfermedad. En este sentido, se ha observado que un subgrupo de pacientes con PV que no reciben tratamiento citorrreductor y que presentan un haplotipo 46/1 homocigoto experimentan un aumento espontáneo importante y sostenido de la carga mutacional de *JAK2V617F* ¹²².

El tratamiento citorrreductor, por su parte, se ha reportado que también puede influir en la modificación de la carga mutacional de *JAK2V617F* durante la evolución de la enfermedad. Varios grupos han analizado el efecto de la hidroxiurea (HU), interferón (IFN) e inhibidores de *JAK2* en la respuesta molecular (RM).

- Hidroxiurea: se ha documentado una tasa de RM parcial en los primeros 6-12 meses de tratamiento con HU en aproximadamente el 30% de los pacientes con PV y TE ^{121,123-126}. Se ha analizado si existen factores biológicos intrínsecos de los pacientes que puedan favorecer la RM en estos pacientes. Por un lado, se observó que la presencia del haplotipo 46/1 del gen *JAK2* no confería ninguna predisposición a la RM y, por otro lado, los polimorfismos en los transportadores de urea *SLC14A1*, *SLC14A2* y *ARG2* mostraron un mínimo efecto, sugiriendo que las características de la propia enfermedad probablemente tengan un impacto superior que las del propio paciente en la probabilidad de alcanzar RM ¹²⁷.
- Interferón pegilado (IFN-peg): consigue un porcentaje valorable de RM parciales en los pacientes con PV e incluso, en un 15-20% de los pacientes, RM completas (desaparición de la carga alélica de *JAK2V617F* en sangre periférica) ^{128,129}. Recientemente se han comunicado los resultados preliminares de un ensayo clínico fase III que compara ropeginterferón alfa-2b vs HU en pacientes con PV, sin observarse diferencias en la proporción de pacientes que alcanzaron RM a los 12 meses de tratamiento. Así, el 22% de los pacientes con HU y el 14% de los pacientes con ropeginterferón alfa-2b consiguieron RMC y el 28% y el 32%, respectivamente, consiguieron RMP ¹³⁰.

- Ruxolitinib: inhibidor oral de JAK1/JAK2 aprobado para los pacientes adultos con MF primaria o secundaria a PV o TE que presentan esplenomegalia sintomática /o síntomas constitucionales, en base a dos grandes estudios pivotaes fase III: COMFORT I (ruxolitinib vs placebo) y COMFORT II (ruxolitinib vs mejor tratamiento disponible) ^{131,132}. Recientemente se han reportado los resultados a los 4 años de los pacientes incluidos en el estudio COMFORT I con una media de reducción de la carga mutacional de *JAK2V617F* del 27% a las 216 semanas, con 12% de pacientes alcanzando una reducción superior al 50% de *JAK2V617F* y menos de 2% de pacientes consiguiendo una respuesta molecular completa ¹³³. Asimismo, el análisis del seguimiento de los pacientes con MF incluidos en el estudio COMFORT II ha demostrado que un tercio de los pacientes *JAK2V617F* evaluables presentaron una reducción > 20% del valor inicial de *JAK2V617F* a la semana 168 (38,3% (18/47)) y a la semana 192 (31% (13/42)) ¹³⁴.

El ruxolitinib ha sido también recientemente aprobado como tratamiento de la PV en pacientes que presentan resistencia o intolerancia a la HU, en base a los resultados de los estudios RESPONSE ^{135,136}. Verstovsek y *col*, han reportado los resultados a la semana 80 del estudio RESPONSE, con una variación de la carga mutacional de *JAK2V617F* del -22% entre los pacientes inicialmente asignados al brazo de ruxolitinib ¹³⁷.

La presencia de mutaciones *non-driver* adicionales puede explicar la existencia de más de una clona en los pacientes con NMP *JAK2* mutadas y conllevar un patrón de respuesta molecular al tratamiento con HU, IFN o ruxolitinib diferente al esperado. En este sentido, los pacientes que no alcanzaron RM con el tratamiento con IFN-peg presentaban una mayor frecuencia de mutaciones adicionales a *JAK2V617F* (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A* e *IDH1/2*) ¹³⁸.

Otro aspecto importante a destacar en referencia a la RM de los pacientes con NMP en tratamiento citorreductor es la escasa información existente sobre la influencia de la carga mutacional a nivel de progenitores hematopoyéticos, y como consecuencia, la presencia de dominancia clonal, en la evolución de la carga alélica de *JAK2V617F* en estos pacientes.

2.2.6. Mutaciones en el exón 12

Con el objetivo de identificar las alteraciones moleculares asociadas al 5% de pacientes con PV *JAK2V617F* negativos, Scott y *col* secuenciaron el gen *JAK2* completo en células eritroides de estos pacientes y descubrieron diferentes mutaciones en el exón 12 (2-4% de las PV), las cuales no están presentes en la TE ni en la MFP⁴¹. Estas mutaciones consisten en cambios puntuales, deleciones, inserciones o sustituciones, que afectan a la zona de la unión entre los dominios SH2 y JH2 y producen un efecto similar a la de la mutación *JAK2V617F*. Las mutaciones en el exón 12 se asocian a un fenotipo más eritroide, con valores de hematocrito y hemoglobina muy elevados, mientras que el recuento de leucocitos y plaquetas suele estar dentro de los límites de la normalidad¹³⁹. Existe poca información sobre la evolución clínica de estos pacientes. En un trabajo de Passamonti y *col* que incluyó 106 pacientes se observó una incidencia similar de trombosis, transformación a MF y LA y supervivencia global que la de los pacientes con PV *JAK2V617F*¹³⁹.

A diferencia de *JAK2V617F*, las mutaciones del exón 12 normalmente se presentan con un patrón heterocigoto y, sólo excepcionalmente, en homocigosis, sugiriendo que la recombinación mitótica es una característica más propia de las PV *JAK2V617F*¹⁴⁰⁻¹⁴³.

De forma similar a *JAK2V617F*, las mutaciones del exón 12 activan de forma constitutiva las vías de señalización activadas por *JAK2*. Cuando se transfectan células BaF3/EpoR con distintas mutaciones se observa un incremento en los niveles de fosforilación de *JAK2*, *STAT5* y *Erk1/2* en ausencia de eritropoyetina⁴¹. En este mismo estudio observaron que la mutación *JAK2K539L* (exón 12) producía una fosforilación mucho más elevada de *JAK2* y *Erk1/2* que la obtenidos con *JAK2* no mutada e incluso *JAK2V617F*. Adicionalmente, y utilizando un modelo murino retroviral, los ratones en los que se transfectaban las células *JAK2K539L* positivas presentaban más eritrocitosis pero menos leucocitosis y trombocitosis, así como una expansión de la serie eritroide en la medula ósea, en comparación con los ratones a los que se transfectaban células *JAK2V617F* positivas⁴¹. Todos estos datos sugieren que la activación de la vía de señalización de *JAK2* es mayor en los casos con

mutaciones en el exón 12 y esto se traduce en el desarrollo de un fenotipo con una eritrocitosis más pronunciada.

2.3. Neoplasias mieloproliferativas con mutación de *CALR*

En diciembre de 2013 se describieron mutaciones en el gen que codifica para la proteína calreticulina (*CALR*) en el 67-88% de los pacientes con TE y MFP que no presentaban mutaciones en *JAK2* y en *MPL*^{43,44}.

2.3.1 Gen *CALR*

El gen *CALR* está localizado en el cromosoma 19p13.2 y codifica para la proteína calreticulina, una chaperona que se localiza en el retículo endoplasmático de la célula donde participa en la regulación de la homeostasis del calcio y en el control del correcto plegamiento de las glicoproteínas sintetizadas^{144,145}. Fuera del retículo endoplasmático, regula los mecanismos de proliferación, apoptosis, fagocitosis y respuesta inmunitaria.

Desde el punto de vista estructural, la proteína calreticulina se caracteriza por presentar tres dominios principales: dominio amino-terminal, dominio rico en aminoácidos prolina y dominio carboxi-terminal, este último caracterizado por presentar aminoácidos de tipo ácido (ácido glutámico y ácido aspártico) que permiten ligar los cationes de Ca²⁺, así como una secuencia KDEL (lisina -K-, ácido aspártico -D-, ácido glutámico -E-, leucina -L-) en el extremo final de la proteína que sería responsable de la localización de la proteína en el lumen del retículo endoplasmático (Figura 10).

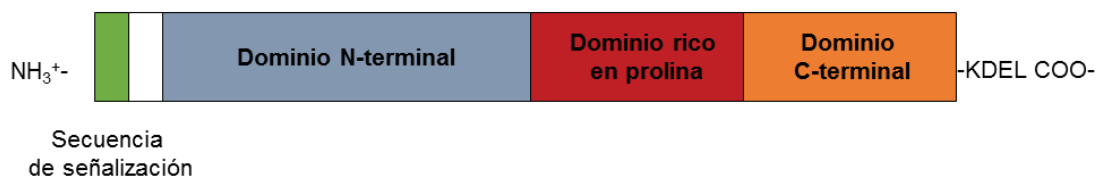


Figura 10. Esquema de los dominios funcionales de la proteína CALR

2.3.2. Mutaciones de CALR

A finales del año 2013 se identificaron mediante técnicas de secuenciación masiva mutaciones somáticas en el gen *CALR* en un alto porcentaje de pacientes con NMP Ph-^{43,44}. Las mutaciones de *CALR* se detectan esencialmente en pacientes con TE (15-30%) y MF (25-35%). Las mutaciones de *CALR* no se han detectado en PV, LA mieloide, síndromes linfoproliferativos, LMC ni en tumores sólidos⁴⁴. El hecho de que las mutaciones en *CALR* se encuentren sólo en enfermedades en las que los megacariocitos juegan un papel predominante como la TE y la MFP, sugiere que esta mutación podría alterar el funcionalismo de los megacariocitos. Dichas mutaciones se han convertido en el segundo marcador molecular en las NMP Ph-. Se considera que las mutaciones de *CALR* y *JAK2* son mutuamente excluyentes, aunque se han reportado algunos casos de coexistencia de ambas mutaciones¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Las mutaciones de *CALR* son principalmente mutaciones heterocigotas, se localizan en el exón 9 y generalmente corresponden a inserciones o deleciones que provocan una alteración de la pauta de lectura. Se han reportado hasta 50 tipos de mutaciones distintas, si bien la deleción de 52 pb (mutación tipo 1) y la inserción de 5 pb (tipo 2) son las mutaciones más frecuentes⁴⁴. Existen diferencias en cuanto a la frecuencia de cada una de las mutaciones de acuerdo con el tipo de NMP. Así, en la TE las frecuencias de mutaciones de *CALR* tipo 1 y tipo 2 son del 55% y 35%, respectivamente, mientras que en la MFP existe un predominio de mutaciones tipo 1 (75%) en comparación con el 15% de tipo 2¹⁴⁹. La característica común de todas ellas es la pérdida de aminoácidos ácidos KDEL en el extremo carboxi-terminal. Como

consecuencia de este cambio en la estructura de la proteína, el extremo carboxi-terminal adquiere una carga neutra o básica que impide la localización de la proteína en el lumen del retículo endoplasmático.

Estudios funcionales en líneas celulares han demostrado que las mutaciones de *CALR* darían lugar a las NMP activando el receptor de la trombopoyetina (MPL) y activando la vía de JAK/STAT ¹⁵⁰⁻¹⁵². La proteína *CALR* mutada requiere tanto del extremo carboxi-terminal mutado como de MPL para su acción neoplásica ^{150,151,153}. Así, la proteína *CALR* mutada se une al extremo N-terminal extracelular de MPL en el retículo endoplasmático de forma similar a la *CALR* no mutada, pero como consecuencia del cambio en el extremo C-terminal, esta interacción física se ve favorecida. Posteriormente, la *CALR* mutada, comportándose como una chaperona anormal, es exportada unida a MPL hasta la superficie celular a través del aparato de Golgi y/u otras vías alternativas ¹⁵⁴. Se desconoce en qué compartimento celular MPL es activado, pero se especula que puede tener lugar en cualquier punto del trayecto entre el retículo endoplasmático y la superficie celular (Figura 11). Varios estudios han demostrado que en este momento se activa la vía de JAK2/STAT y la cascada de STAT 5/3/1, MAP-cinasa y PI3-K. No obstante, cabe destacar que se han descrito diferencias en la vía predominantemente activada según el genotipo de la NMP. Así, la vía de señalización de las mutaciones de *CALR* depende mayoritariamente de vías de STAT y MAP-cinasa, y en cambio, las de *JAK2V617F*, de las vías de STAT y PI3-K ¹⁵¹. Adicionalmente, cabe destacar que se ha observado que la proteína *CALR* mutada también puede activar G-CSFR, pero no otros receptores ¹⁵¹. No obstante, el papel que la activación de G-CSFR puede jugar en la patogenia de las NMP con mutación de *CALR* es aún desconocido.

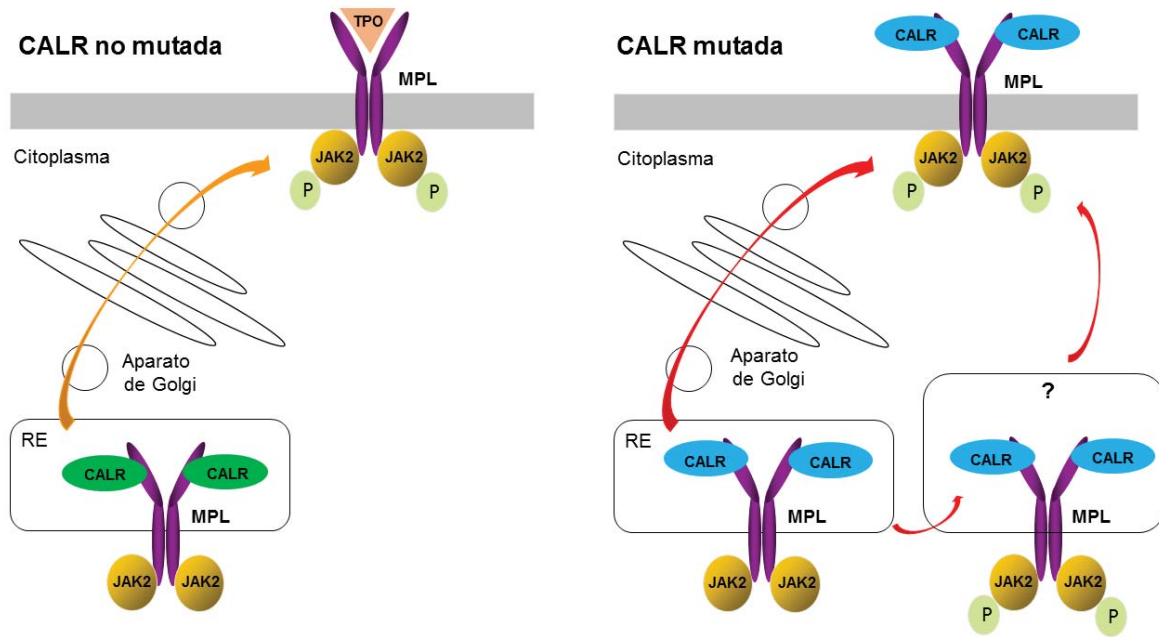


Figura 11. Mecanismo de acción de la proteína CALR mutada (adaptado de Vainchenker & Kralovics 2016¹⁵⁵).

La importancia de *MPL* en la patogenia de las NMP con mutación de *CALR* se puso de manifiesto cuando en un modelo de ratones *MPL* knock-out, la mutación tipo 1 de *CALR* no fue suficiente para el desarrollo de trombocitosis¹⁵². Por otro lado estos mismos autores demostraron que los ratones que habían sido transfectados con un gen *CALR* en el que se había deletado el exón 9 no desarrollaban trombocitosis, sugiriendo que el factor determinante para el fenotipo de NMP está relacionado con el extremo C-terminal¹⁵². Por qué la proteína CALR mutada se une a MPL y de forma menos frecuente a G-CSFR, pero no a otros receptores de citocinas, es aún desconocido. Se ha postulado que la estructura terciaria de CALR mutada es distinta de la CALR no mutada, facilitando la unión específica con MPL. También es posible que la capacidad disminuida de absorción de calcio de la CALR mutada debido a la pérdida de los aminoácidos cargados negativamente podría estabilizar la asociación con MPL¹⁵⁶.

Desde la descripción de las mutaciones en el gen *CALR*, han sido numerosos los estudios publicados en relación a las implicaciones diagnósticas, fenotípicas, clínicas y evolutivas que aporta esta nueva mutación.

Implicaciones diagnósticas

Como se ha mencionado anteriormente, las mutaciones en el exón 9 del gen *CALR* se han descrito en un 15-30% de los pacientes con TE y hasta en un 35% de los pacientes con MFP. En este sentido, en la revisión de los criterios diagnósticos de las neoplasias hematológicas de la OMS publicada recientemente, entre otras modificaciones, se ha incorporado la determinación de la mutación de *CALR*³⁰.

Implicaciones fenotípicas

Desde un punto de vista fenotípico, en la TE la mutación de *CALR* se ha asociado a pacientes más jóvenes, predominio de sexo masculino, menor cifra de hemoglobina, hematocrito y leucocitos y a una mayor trombocitosis respecto los pacientes con *JAK2V617F*¹⁵⁷⁻¹⁶². Asimismo, en el estudio de Álvarez-Larrán y *col*, en el que analizaron pacientes con TE y mutación de *CALR* de bajo riesgo de trombosis, también se demostraron niveles más altos de LDH y más incidencia de esplenomegalia, es decir, un fenotipo más próximo a MF¹⁶³. De forma similar, en la MFP las mutaciones de *CALR* se han asociado a niveles más bajos de leucocitos y niveles más elevados de plaquetas que los pacientes *JAK2* positivos^{147,159}. Estos datos apoyan que el fenotipo asociado a *CALR* y *JAK2* esté predominantemente vinculado a una expansión de la serie megacariocítica y de la serie eritroide, respectivamente

Adicionalmente a estas características fenotípicas, hay datos que también sugieren que los pacientes con TE presentan características diferentes a nivel molecular e histológico de acuerdo con el genotipo. Desde el punto de vista molecular, un estudio reciente demostró mediante análisis de PICX, clonalidad en el 88% de los pacientes con mutación de *CALR* en comparación con el 26% de los pacientes con mutación *JAK2V617F*¹⁶⁴. Por otro lado, recientemente dos grupos han descrito diferencias histológicas en los pacientes con TE y MF de acuerdo con el estado mutacional. Así, en comparación con los casos *CALR* no mutados, los pacientes con TE *CALR*-mutada presentaban más atipias y agrupaciones densas de megacariocitos y aquellos con MF *CALR*-mutada más presencia de núcleos hipercromáticos^{165,166}.

Implicaciones pronósticas

Las mutaciones de *CALR* parecen identificar un grupo de pacientes que presentan mejor pronóstico que los pacientes con mutación *JAK2V617F*.

En la TE, los pacientes con mutación de *CALR* tienen una menor tendencia a presentar complicaciones trombóticas en comparación con los pacientes *JAK2* positivos^{44,157,158,161}. Con respecto a la probabilidad de transformación a mielofibrosis, se ha descrito que los pacientes con mutación en *CALR* presentan un riesgo mayor que los pacientes *JAK2V617F*^{43,160}. Por el contrario, otros autores no observan ninguna asociación significativa entre la probabilidad de transformación a MF y el genotipo^{157,158}. Teniendo en cuenta el tipo de mutación de *CALR*, se ha observado un mayor riesgo de transformación a MF en los pacientes con *CALR* tipo 1 en comparación con aquellos con mutación tipo 2¹⁵⁶. Finalmente, mientras que algunos autores observan una mejor supervivencia en los pacientes *CALR* mutados, otros no han observado diferencias significativas según el tipo de mutación^{43,158–160}.

En el caso de los pacientes con MF, los pacientes con *CALR* mutada presentan mejor supervivencia que los pacientes con mutación de *JAK2V617F*^{44,159}. Los pacientes con MF sin mutación en *JAK2*, *CALR* ni *MPL*, los conocidos como triples negativos, forman el grupo de peor pronóstico. Dicho pronóstico es incluso peor si a esta ausencia de mutaciones driver se añade la presencia de mutaciones en el gen *ASXL1*, implicado en la regulación epigenética¹⁴⁷. Existen resultados contradictorios en las diferentes series que han estudiado el impacto que podría tener el tipo de mutación de *CALR* sobre la supervivencia^{149,156,159}.

2.3.3. Hematopoyesis de las NMP con mutación de *CALR*

En los estudios iniciales en los cuales se describió la mutación de *CALR* en las TE y MF *JAK2* y *MPL* negativas, se identificó dicha mutación en progenitores multipotentes capaces de generar progenie mieloide y eritroide y en células CD34+ aisladas mediante *sorting*. Este hallazgo apoya el hecho que la adquisición de mutaciones en el gen *CALR* se trata de un evento temprano

en el desarrollo de la enfermedad ⁴³. Aunque tanto *JAK2V617F* como las mutaciones de *CALR* se originan en la HSC y, por lo tanto, se consideran eventos tempranos, se especula que estas últimas aparecen de forma más precoz durante la evolución de la enfermedad. Existen varios datos que apoyarían esta hipótesis. En primer lugar, la carga mutacional de los granulocitos de pacientes con TE *CALR* mutada es superior en comparación con aquellos con mutación *JAK2V617F*, sugiriendo, por tanto, una mayor ventaja proliferativa de la clona *CALR* mutada a nivel progenitor ¹⁵⁷. Por otro lado, otro aspecto que apoyaría que la mutación de *CALR* es un evento más temprano que *JAK2V617F* en las NMP es el orden de aparición de las mutaciones adicionales. Así, la mutación de *CALR* es, en la mayoría de los casos, la primera mutación y las mutaciones adicionales aparecen posteriormente. En cambio, *JAK2V617F* puede estar precedida de otras mutaciones como *TET2*, *DNMT3A* y *ASXL1* ^{43,44,146}.

La presencia de mutaciones recurrentes en *CALR* sugiere que éstas tienen un papel clave en el desarrollo de las NMP. Se ha demostrado que la presencia de dichas mutaciones son suficientes para desarrollar un fenotipo compatible con NMP *in vivo*, demostrando que éstas constituirían mutaciones *driver* en las NMP ^{152,153}. En este sentido, Marty *y col*, usando un modelo murino retroviral observaron que los ratones transfectados con *CALRdel52* o *CALRins5* desarrollaban a las 16 semanas después del trasplante un cuadro fenotípico de NMP similar a la TE, caracterizado por trombocitosis e hiperplasia megacariocítica, hallazgo no observado en los ratones *CALR* no mutados. De forma interesante, aquellos ratones *CALRdelex9* (ausencia de exón 9) tampoco desarrollaban trombocitosis, sugiriendo que el extremo C-terminal juega un papel oncogénico determinante para el desarrollo del fenotipo de NMP ¹⁵². Teniendo en cuenta la especificidad de las mutaciones de *CALR* por la línea megacariocítica, estos mismos autores analizaron la expresión de *CALR* a través de tinciones inmunohistoquímicas en muestras de médula ósea de ratones mutados. De acuerdo con otros estudios ^{167,168}, demostraron que *CALR* se expresaba de forma predominante en la línea megacariocítica y en células mieloides inmaduras. Por el contrario, la expresión de *CALR* en la serie eritroide y en las células mieloides más maduras fue prácticamente ausente ¹⁵³.

Adicionalmente, estudios de citometría de flujo en poblaciones de células HSC y HPC han observado una expansión del compartimento LSK (Lin-Sca1+, cKit+, enriquecido por HSC) significativamente superior en los ratones *CALR* mutados respecto a los no mutados. Por el contrario, no se identificó una expansión del compartimento de células progenitoras mieloides ¹⁵³.

Se han reportado diferencias fenotípicas en los pacientes con TE y MF de acuerdo con el tipo de mutación de *CALR*. El origen de estas diferencias también ha sido estudiado en ratones. Tal y como se ha mencionado anteriormente, Marty y *col*, usando un modelo murino retroviral, demostraron que los ratones *CALR*-mutados desarrollaban trombocitosis y observaron diferencias según el tipo de mutación. Así, los ratones que expresaban mutación tipo 1 presentaban una trombocitosis más marcada y una mayor probabilidad de progresión a MF, mientras que los ratones con mutación tipo 2 mostraron una trombocitosis más moderada y un cuadro fenotípico más próximo a la TE ¹⁵². Se ha postulado que estas diferencias fenotípicas entre la *CALR* del52 y *CALR* ins5 podrían explicarse por el nivel de la hematopoyesis en el cual se inicia la amplificación: HSC y progenitores megacariocíticos en la *CALR*del52 y *CALR*ins5, respectivamente (Figura 12). Otros autores han descrito que estas diferencias fenotípicas también podrían ser consecuencia de diferencias en el metabolismo del calcio. Así, se ha observado que los megacariocitos de los pacientes con *CALR*del52 presentaban mayores oscilaciones de concentración de calcio a nivel del citosol ¹⁵⁶.

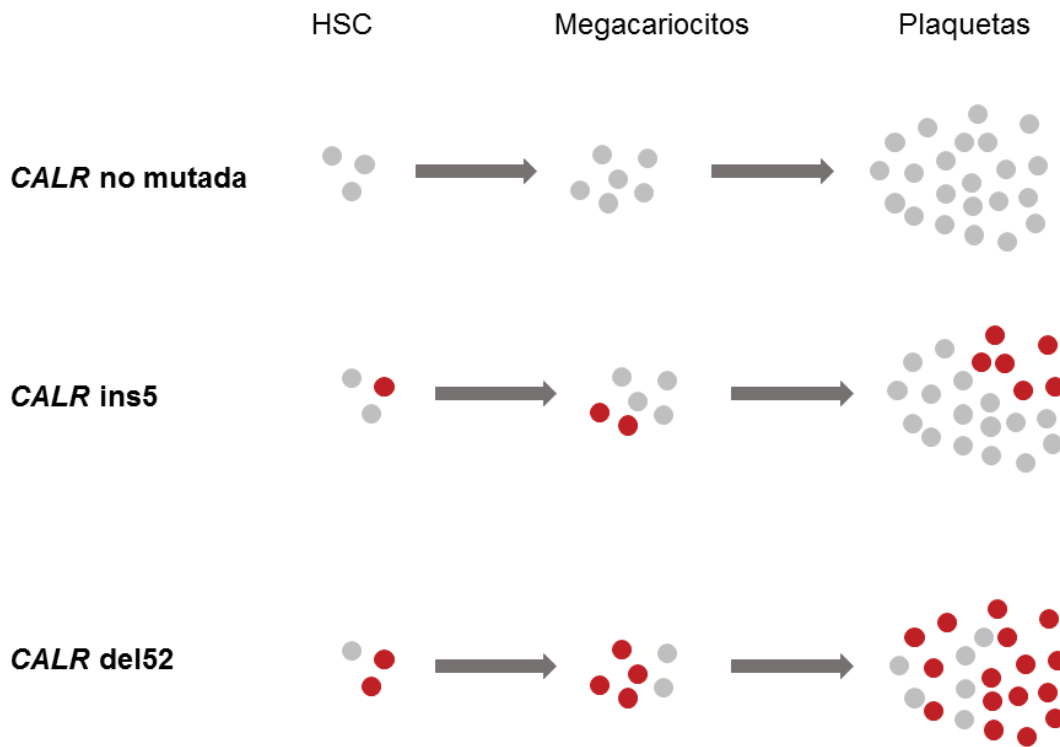


Figura 12. Representación esquemática de las diferencias en la amplificación entre *CALRdel52* y *CALRins5*.

Como consecuencia de las diferentes hipótesis, la mutación tipo 1 podría jugar un papel importante en la dominancia clonal de las NMP *CALR* mutadas^{152,156}.

Por otro lado, estudios en líneas celulares demostraron que la mutación de *CALR* sólo activa de forma débil la vía PI3-K, contribuyendo a aumentar la capacidad de autorrenovación de las HSC y, como consecuencia, favoreciendo la dominancia clonal¹⁵². Este podría ser un mecanismo que pudiese explicar una superior carga mutacional de *CALR* en comparación con *JAK2V617F* en los pacientes con TE¹⁵⁷.

2.3.4. Carga mutacional en las NMP *CALR* mutadas

La carga mutacional de *CALR* en los pacientes con TE, en comparación con aquellos con *JAK2V617F* es alta, siendo de aproximadamente el 40% ¹⁵⁷. De igual modo, se ha descrito una media de carga mutacional del 51% en los pacientes con MF primaria *CALR* mutada ¹⁶⁹.

Existe escasa información sobre los patrones evolutivos de la carga mutacional de *CALR* en los pacientes con TE y MF. En el grupo de pacientes con TE sin tratamiento citorrreductor no se han reportado variaciones significativas de la carga mutacional de *CALR* durante la evolución de la enfermedad ¹⁷⁰.

De forma similar a los estudios con *JAK2V617F*, la variación del porcentaje de carga mutacional de *CALR* ha sido evaluada en diferentes series de pacientes de acuerdo con el tratamiento citorrreductor recibido.

- Hidroxiurea: en el año 2014, Bellosillo y col, analizaron el patrón evolutivo de *CALR* en una serie de 25 pacientes con TE, 7 sin tratamiento citorrreductor y 18 con tratamiento citorrreductor (6 anagrelide y 12 HU), y observaron que la carga mutacional de *CALR* se mantenía estable en todos los grupos ¹⁷¹. Más recientemente, un grupo francés ha demostrado que la carga mutacional de *CALR* se mantiene estable después de una mediana de tratamiento con HU de 36 meses, siendo la carga mutacional inicial del 34% y la de la última muestra del 38% ¹⁷⁰.
- IFN pegilado: en una serie de 31 pacientes con TE *CALR*-mutada en tratamiento con IFN (primera línea de tratamiento n=5; segunda línea de tratamiento después de HU n=16 o Ag n=1; tratamiento después de 2 o más líneas n=9) se ha documentado RM en 13 pacientes (42%), dos de ellos alcanzando RM completa ¹⁷⁰. Por otra parte, un grupo danés ha evaluado la dinámica de la carga mutacional de *CALR* en 21 pacientes con NMP en pacientes en tratamiento con alfa IFN, entre los que incluyeron 4 pacientes con MFP. De ellos, 1 obtuvo RM parcial de acuerdo con los criterios de la *International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT)* ^{172,173}.

- Ruxolitinib: Guglielmelli *y col* han reportado los resultados del análisis retrospectivo de los pacientes con MF con mutación de *CALR* incluidos en el estudio COMFORT II. La carga mutacional basal fue de 51 +/- 12,8% (n=20) y la correspondiente a los 60 meses de tratamiento (n=18) del 54,5 +/- 15%. Los autores destacan que 3 de los 18 pacientes presentaron una disminución igual o superior al 10% durante el tratamiento con ruxolitinib e incluso, un paciente pasó de una carga mutacional basal de *CALR* del 48% al 5% después de 180 semanas de tratamiento ¹⁶⁹.

De forma similar a lo que sucede en la RM en los pacientes con NMP *JAK2V617F*, la presencia de mutaciones adicionales en genes *non-driver* en aquellos pacientes *CALR*-mutados también puede modificar la respuesta al tratamiento. Este aspecto ha sido ampliamente analizado en el estudio de Verger *y col*. Seis de los 31 pacientes con TE presentaban mutaciones adicionales en los genes *TET2*, *ASXL1*, *IDH1* o *TP53*. Las diferentes clonas evolucionaban de forma independiente e imprevisible durante el tratamiento con IFN-peg. En ese sentido, por ejemplo, la mutación de *IDH2* P140L se halló en 2 pacientes y en uno de ellos la carga mutacional permaneció estable y en el otro caso presentó un descenso significativo durante el tratamiento ¹⁷⁰.

2.4. Neoplasias mieloproliferativas con mutación de *MPL*

Posteriormente al descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*, Pikman *y col*, identificaron mutaciones que afectaban al gen *MPL* (*myeloproliferative leukemia protooncogen*) que codifica para el receptor de la trombopoyetina (TPO) ⁴². Estas mutaciones se localizan en el exón 10 del gen *MPL* y afectan principalmente al aminoácido triptófano en la posición 515 y, en menor frecuencia al 505, que forman parte de una región anfipática localizada en el dominio yuxtamembrana que impide la dimerización del receptor en ausencia del ligando. Las alteraciones descritas en esta región (W515K, W515L, W515A, S505N) provocan la dimerización del receptor en ausencia del ligando y la activación constitutiva de la vía de transducción de señales dependiente de este receptor (Figura 13) ^{42,174}. Recientemente, se ha descrito la presencia de

mutaciones localizadas fuera del exón 10, principalmente en los exones 4 y 5 del gen *MPL*, en pacientes con TE triple negativos ^{175,176}.

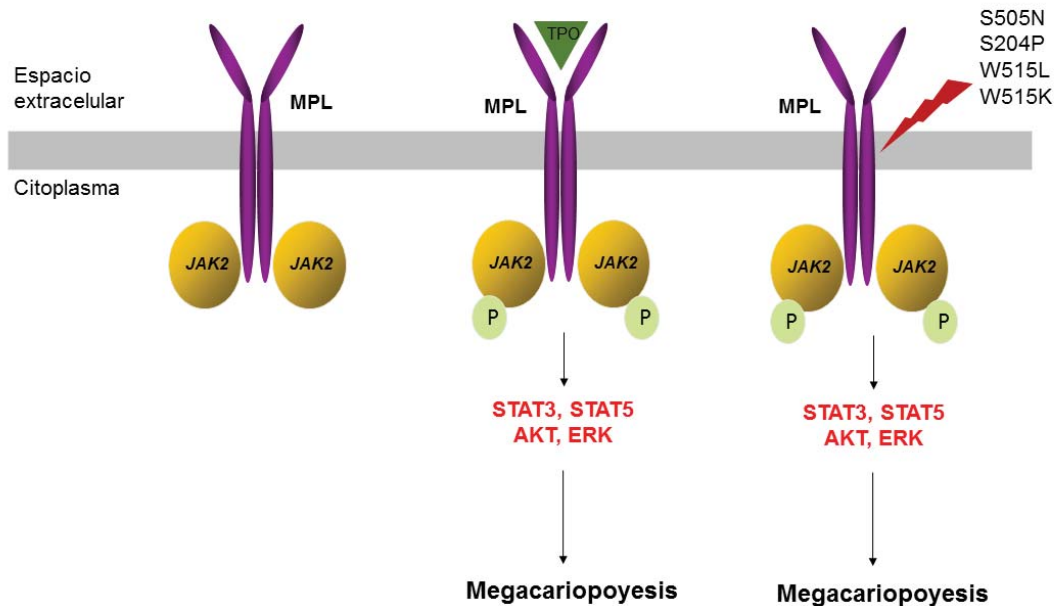


Figura 13. Representación del mecanismo de acción del receptor de la trombopoyetina (MPL).

Las mutaciones en *MPL* se han descrito en el 5% de MFP y en el 1-3% de pacientes con TE. La mutación S505N fue inicialmente identificada en casos de trombocitosis hereditaria ¹⁷⁷. Se han reportado casos de pacientes con coexistencia de mutación *MPLW515L/K* y *JAK2V617F*, lo que indica que ambas mutaciones no son mutuamente excluyentes ^{174,178,179}. Asimismo, también se ha reportado la coexistencia de dos mutaciones de *MPL* en un paciente con TE (*W515L, 2505N*) ¹⁸⁰.

En los pacientes con PV u otras neoplasias mieloides no se detectan mutaciones del gen *MPL*, lo que sugeriría que estas mutaciones favorecerían el desarrollo de la línea megacariocítica más que la eritroide. En este sentido, Chaligné y *col* demostraron que la mutación de *MPL* tiene lugar en un progenitor hematopoyético multipotente y que, además, induce una diferenciación megacariocítica espontánea ¹⁸¹.

De forma similar a las mutaciones de *JAK2*, los estudios *in vitro* en los que se transfectan las mutaciones W515L/K y S505N en células Ba/F3 han demostrado que dichas alteraciones confieren crecimiento celular independiente a la unión de citocinas con activación de JAK2, STAT3, STAT5, AKT y ERK ^{42,177,182}.

El papel etiopatogénico de *MPL* W515L se puso de manifiesto en un modelo murino retroviral en el que los ratones trasplantados con progenitores portadores de dicha mutación desarrollaban un cuadro clínico con fenotipo de MF, caracterizado por leucocitosis, trombocitosis, esplenomegalia y fibrosis medular, pero no eritrocitosis ⁴².

Las mutaciones de *MPL* se han asociado a algunas características clínicas diferenciales en los pacientes con TE y MF. Por una parte, en el caso de la MF, los pacientes *MPL* mutados tienen un fenotipo clínico caracterizado por mayor tendencia a la anemia y con más dependencia transfusional, en comparación con los *MPL* no mutados. No se han observado diferencias significativas en otros parámetros hematológicos ni en la esplenomegalia ¹⁸³. Por otra parte, los pacientes con TE *MPL* mutada, comparado con los *JAK2V617F*, muestran una cifra de hemoglobina inferior y una trombocitosis más elevada, con reducción de la celularidad eritroide y granulocítica en la médula ósea ^{179,184}.

2.5. Complejidad clonal

Tradicionalmente se habían considerado a las NMP como neoplasias con un perfil genómico simple, de acuerdo con el hecho de que las alteraciones citogenéticas son infrecuentes comparadas con otras neoplasias hematológicas. En los últimos años, se ha demostrado que la complejidad clonal de las NMP es similar a la de otras enfermedades mieloides como los síndromes mielodisplásicos (SMD) y las LA.

La mediana de mutaciones por paciente es de 6,5 en pacientes con PV, 6,5 en pacientes con TE y de 13 en los pacientes con MF ($p=0,008$) ⁴³. Los genes habitualmente mutados son similares a los que se describen en SMD y LA y

afectan a genes involucrados en la regulación epigenética (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH1*) y al *splicing* del ARN (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) (Tabla 4). También se han descrito, en grado variable, mutaciones en genes implicados en transformación aguda como *TP53* y *RUNX1*. Otro aspecto a destacar es que se han observado diferencias en la coexpresión de mutaciones adicionales de acuerdo con el genotipo de NMP, siendo más frecuentes en aquellos pacientes *CALR* mutados en comparación con los *JAK2* mutados ⁴³. Todo lo anteriormente expuesto indica la complejidad clonal que subyace en la patogenia y en el fenotipo de estas enfermedades.

Tabla 4. Frecuencia y distribución de las mutaciones adquiridas en las NMP Ph negativas.

		Gen	PV (%)	TE (%)	MF (%)
Mutaciones <i>driver</i>		<i>JAK2V167F</i>	95-97	50-60	50-60
		<i>JAK2 exón 12</i>	1-2	0	0
		<i>CALR</i>	0	25	30
		<i>MPL</i>	0	3-5	5-10
Mutaciones adicionales	Vías de señalización	<i>CBL</i>	-	0-2	5-10
		<i>LNK (SH2B3)</i>	2	2-6	3-6
	Procesos epigenéticos	<i>TET2</i>	10-20	4-5	10-20
		<i>DNMT3A</i>	5-10	2-5	8-12
		<i>ASXL1</i>	2	5-10	10-35
		<i>EZH2</i>	1-2	1-2	7-10
		<i>IDH1/IDH2</i>	2	1	5
	Maquinaria del <i>splicing</i>	<i>SF3B1</i>	2	2	4
		<i>SRSF2</i>	-	-	4-17
		<i>U2AF1</i>	< 1	< 1	1-8

Mutaciones en genes implicados en señalización intracelular

Recientemente se han descrito mutaciones en los genes *LNK* y *CBL* que producen un *feedback* negativo de la vía de transducción de señales JAK/STAT.

LNK

El gen *LNK* (*Lymphocyte Adaptor Protein*), también conocido como *SH2B3* (*SH2B Adaptor Protein 3*), es un gen localizado en el cromosoma 12q24 que codifica para una proteína que pertenece a una familia de proteínas adaptadoras que juega un papel importante en la hematopoyesis al regular negativamente a JAK2, inhibiendo así la vía de señalización JAK/STAT¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. En este sentido, estudios murinos *knock-out* observaron que aquellos ratones a los cuales se les eliminó dicho gen desarrollaban un cuadro compatible con NMP con trombocitosis, esplenomegalia y fibrosis¹⁸⁸.

Se han descrito mutaciones con baja frecuencia en TE, MFP y en casos de eritrocitosis y, con mayor frecuencia (13%), en transformaciones a LA¹⁸⁹.

CBL

El gen *CBL* (*Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*) es un gen localizado en el cromosoma 11q23 que codifica para una proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa que media la ubiquitinación, internalización y degradación del receptor activado (TPOR, KIT y FLT3) así como de proteínas con actividad tirosina cinasa¹⁹⁰.

Se han descrito mutaciones en *CBL* en varias neoplasias mieloides, especialmente en la leucemia juvenil mielomonocítica, En fase crónica, estas mutaciones son infrecuentes, encontrándose en un 5-10% de pacientes con MF y raramente en PV y TE^{112,191}.

Mutaciones en genes implicados en procesos epigenéticos

TET2

Las mutaciones en *TET2* (*Ten-Eleven Translocation-2*) fueron las primeras alteraciones somáticas recurrentes descritas en los pacientes con NMP en un gen que no está directamente involucrado en la vía de señalización JAK2/STAT⁹⁵. El gen *TET2*, localizado en el cromosoma 4q24, pertenece a una familia constituida por tres genes (*TET1*, *TET2*, *TET3*). Codifica para una enzima 2-oxoglutarato hidroxilasa dependiente de hierro (II) que transforma los residuos de 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina. La función de este nucleótido modificado no está claro, pero podría participar en la desmetilación de citocinas¹⁹²⁻¹⁹⁴. Se han detectado tanto mutaciones puntuales (*nonsense* o *missense*) como pequeñas deleciones e inserciones que se distribuyen a lo largo de todo el gen y que producen la pérdida de función de la proteína.

El gen *TET2* está mutado en un 14% de las NMP *Ph* negativas, siendo menos frecuente en la TE que en la PV o MFP, y puede coexistir tanto con *JAK2V617F* como con mutaciones de *CALR* (menos frecuente). Asimismo, las mutaciones de *TET2* también se han descrito en otras neoplasias mieloides, especialmente en SMD (20-30%) y LMMC (20-45%)⁹⁵. Las mutaciones de *TET2* se adquieren a nivel de las HSC⁹⁵, bien antes o después de *JAK2V617F*¹⁹⁵. Un estudio realizado en una amplia serie de pacientes ha demostrado que las mutaciones de *TET2* se adquieren predominantemente antes que *JAK2V617F*¹⁴⁶.

La primera demostración del papel de las mutaciones de *TET2* en la hematopoyesis de las NMP se puso de manifiesto mediante un modelo murino basado en xenotrasplante. Las células CD34+ *JAK2V617F/TET2* mutadas injertaban de forma más eficaz en los ratones NOD/SCID en comparación con aquellas células CD34+ *JAK2V617F/TET2* no mutadas⁹⁵. Más recientemente, 4 modelos murinos *knock-out* han demostrado de forma similar que la pérdida de función de *TET2* favorece la autorrenovación de las HSC y el desarrollo de NMP similar a LMMC¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. Adicionalmente, las mutaciones de *TET2* se han descrito en pacientes de edad avanzada que desarrollan una hematopoyesis clonal pero sin evidencia de enfermedad hematológica²⁰⁰. Todos estos datos

sugieren, por lo tanto, que las mutaciones de *TET2* confieren ventaja clonal a nivel progenitor más que conducir a la diferenciación y sobreexpresión de células maduras característica de las NMP.

Para discernir el efecto de la coexistencia de *JAK2V617F* y mutaciones de *TET2* a nivel progenitor, Chen *y col* y Kameda *y col*, generaron modelos murinos *JAK2/TET2*. Ambos grupos observaron que los ratones con coexistencia de las dos mutaciones (*JAK2V617F/TET2* mutado) presentaban una ventaja proliferativa de las HSPC y una marcada expansión de los precursores mieloides y eritroides comparado con los ratones sólo con *JAK2V617F* o sólo con *TET2* mutado^{201,202}.

Recientemente, Ortmann *y col* han genotipado colonias hematopoyéticas de pacientes con NMP *JAK2* y *TET* mutadas con el objetivo de elucidar el efecto del orden de adquisición de las mutaciones. Estudiaron los progenitores más inmaduros de 13 pacientes (*JAK2-first* n=7, *TET2-first* n=6). Demostraron que los pacientes *TET2-first* presentaban un predominio de progenitores mieloides comunes (p=0,001). Por el contrario, los progenitores megacariocíticos y eritroides eran más prevalentes en los pacientes *JAK2-first* (p<0,001), sugiriendo que la mutación *JAK2V617F* confiere una mayor capacidad de diferenciación hacia células más maduras⁸⁰. Estos autores han sugerido que el orden de las mutaciones podría modificar el fenotipo de las NMP. En este sentido, en comparación con los pacientes *TET2-first*, los *JAK2-first* eran más jóvenes, tenían con mayor frecuencia un fenotipo de PV y, a pesar de la edad, presentaban una mayor probabilidad de trombosis⁸⁰.

Todos estos datos sugieren que las mutaciones de *TET2* favorecen la proliferación y, por lo tanto, contribuyen a la dominancia clonal a nivel progenitor y que las mutaciones V617F del gen *JAK2* participa en la diferenciación de las células mutadas con la consiguiente expresión fenotípica de las NMP. Esta hipótesis es congruente con el hecho que la carga mutacional de *JAK2V617F* a nivel progenitor en los pacientes con TE y PV es baja, pero en las fases más avanzadas de la enfermedad, en las cuáles es más probable la presencia de mutaciones adicionales en genes epigenéticos, hay un predominio del clon mutado.

DNMT3A

El gen *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3 A*) está localizado en el cromosoma 2p23 y codifica para un ADN metiltransferasa. Aunque se han descrito mutaciones a lo largo de toda la secuencia codificante del gen, sobretodo se hallan en el exón 23 de *DNMT3A* y la más frecuente es la de la posición R882. Las mutaciones dan lugar a una pérdida de función de la proteína. La frecuencia de las mutaciones en *DNMT3A* se ha descrito en aproximadamente el 10% de los pacientes con PV o MFP, siendo mayor en casos de transformación blástica ²⁰³. Las mutaciones de *DNMT3A* se han relacionado con un peor pronóstico y una supervivencia reducida en los pacientes con LAM, pero no existen estudios que demuestren su impacto en el pronóstico y la supervivencia en los pacientes con NMP ²⁰⁴.

En un modelo murino *knock-out* en el cuál se eliminó el gen *DNMT3A* a los ratones, se demostró que la pérdida de dicho gen produce una expansión del compartimento de células HSC ²⁰⁵, sugiriendo que las mutaciones de *DNMT3A*, igual que las de *TET2*, confieren una ventaja proliferativa y como consecuencia, contribuyen al desarrollo de dominancia clonal, resultados similares a los obtenidos por Nangalia y *col* ²⁰⁶. No obstante, las mutaciones en *DNMT3A* también podrían participar en la presentación del fenotipo de NMP, de acuerdo con un modelo murino de R882H en el cuál los ratones desarrollaron proliferación mieloide y trombocitosis ²⁰⁷.

Lundberg y *col* reportaron que estas mutaciones podían adquirirse antes o después de *JAK2V617F* ¹⁴⁶. En la misma línea, se han genotipado colonias de 13 pacientes con NMP con mutación en *DNMT3A* (con coexistencia de *JAK2V617F* n=10; de *MPL* n=2; de *CALR* n=1). En los ocho pacientes en los cuáles se pudo determinar el orden de las mutaciones, se observó que los 4 pacientes con *DNMT3A-first* desarrollaban un cuadro clínico compatible con TE, mientras que aquellos que adquirían *DNMT3A* de forma secundaria desarrollaban un fenotipo más próximo a PV o MF post PV ²⁰⁶.

ASXL1

El gen *ASXL1* (*Additional Sex Combs-Like 1*) se localiza en el cromosoma 20q11.21 y codifica una proteína implicada en el remodelamiento de la cromatina. Se han detectado mutaciones que producen un codón stop (*nonsense*) o una alteración de la pauta de lectura y que se localizan fundamentalmente en el exón 12 de este gen. Estas mutaciones hacen que se pierda el dominio PHD en la región carboxiterminal^{208,209}. Su frecuencia es baja en TE (4%) y PV (7%), siendo mucho más alta en casos evolucionados a MF o en la MFP (20%)^{112,208}.

En un modelo murino *knock-out* se observó que la pérdida de función de *ASXL1* se asociaba a un fenotipo con características de MF y SMD: anemia, leucopenia, displasia, hematopoyesis extramedular y esplenomegalia²¹⁰. De forma interesante, en este mismo trabajo se demuestra que la pérdida de *ASXL1* también se asocia a una disminución de la capacidad de autorrenovación de las HSC, pero que se recupera con la coexistencia de mutación en *TET2*, un gen frecuentemente co-mutado con *ASXL1* en los pacientes con SMD²¹⁰.

EZH2

El gen *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*) se localiza en el cromosoma 7q35 y codifica para una proteína con actividad metiltransferasa que pertenece al complejo *polycomb repressor complex 2* (*PRC2*) que regula negativamente la expresión de genes. Las mutaciones de este gen son mucho más frecuentes en pacientes con MFP o MF post-PV/TE y menos frecuentes en TE y PV, por lo que se le atribuye un papel importante en la transformación mielofibrótica. También se pueden detectar en otras neoplasias mieloides y linfoides²¹¹⁻²¹³. Se asocian a un mal pronóstico en la MFP, con reducción de la supervivencia global y un riesgo aumentado de transformación a LA²¹⁴.

Son mutaciones de pérdida de función como muestra el hecho de que los ratones *EZH2 knock-out* simulen un fenotipo de SMD/NMP²¹¹. Además, la expresión simultánea de mutación en el gen *TET2* daba lugar a una

exacerbación del cuadro clínico inducido en los ratones, sugiriendo que su función principal recae en la progresión de la enfermedad ²¹⁵. El efecto de las mutaciones de *EZH2* en las NMP ha sido también estudiado por Shimizu y *col* ²¹⁶. Han demostrado que las mutaciones de *JAK2V617F* y de *EZH2* contribuyen de forma sinérgica en las HSC al desarrollo de las NMP. Asimismo, demuestran que el fenotipo de los ratones *JAK2V617F* se acentúa cuando también presentan *EZH2* mutado, con una trombocitosis y neutrofilia más destacada y con más probabilidad de evolución a MF y una reducción de la supervivencia. Estos ratones, además, presentan una expansión de las HSC y HPC y mayor diferenciación megacariopoyética en detrimento de la eritropoyesis.

IDH1/IDH2

Los genes *IDH* (*isocitrate dehydrogenase*) 1 e *IDH2* se localizan en los cromosomas 2q33.3. y 15q26.1, respectivamente, y codifican para las proteínas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 que están implicadas en la transformación del NADP⁺ a NADPH. Las mutaciones en estos genes se describieron inicialmente en gliomas y posteriormente en LA *de novo* y son infrecuentes en otros tumores. Como consecuencia de las mutaciones en *IDH1/IDH2* se altera el metabolismo del isocitrato produciéndose un metabolito que inhibe a *TET2* ²¹⁷. En las NMP Ph- dichas mutaciones son infrecuentes en la fase crónica, pero se detectan en aproximadamente en 22% de los casos de fase blástica ²¹⁸.

Mutaciones en genes implicados en la maquinaria del *splicing*

Las mutaciones en los genes implicados en el procesamiento del ARN mensajero (o *splicing*) han sido descritas en neoplasias hematológicas e incluyen los genes: *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1* ²¹⁹. Los cuatro genes codifican para proteínas que forman parte del complejo proteico que realiza el procesamiento del ARN mensajero.

Las alteraciones en el gen **SF3B1** (*Splicing Factor 3B, subunit 1*), que codifica para un componente básico de la maquinaria de empalme de ARN, se han reportado en el 2-4 % de los casos con NMP. Dichas mutaciones se han descrito sobre todo en SMD, especialmente en la ARSA (ARSA o ARSA-t) donde pueden encontrarse hasta en 65% de los casos ²²⁰. Cabe destacar que en la RARS-t, *SF3B1* puede asociarse a *JAK2V617F*. Por otra parte, las mutaciones en el gen **SRSF2** (*Splicing Factor Serine/Arginine-Rich 2*), las más frecuentes en genes del *splicing*, se detectan en LMMC, así como SMD, MF y NMP evolucionadas a LAM ^{219,221-223}. Confieren un pronóstico desfavorable especialmente en la MFP ²²⁴. Finalmente, las mutaciones de **U2AF1** (*U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor*) se asocian a una intensa anemia y trombocitopenia en MFP ²²⁵.

Un punto importante a destacar es que todas estas mutaciones son especialmente prevalentes en los pacientes con MF triple negativas, es decir, aquellos que carecen de mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*.

Mutaciones en genes involucrados en la progresión a leucemia aguda

Se han descrito mutaciones en el gen supresor de tumores **TP53** en alrededor del 40-50% de los casos con LA post NMP. Dichas mutaciones incluyen tanto mutaciones *missense* como deleciones del gen *TP53* o amplificaciones del cromosoma 1q que codifica para *MDM4*, un factor inhibidor de *TP53* ¹¹⁴. En la fase crónica de la NMP se pueden hallar mutaciones de *TP53* en estado heterocigoto, pero la evolución a LA se asocia a la adquisición de la mutación en el segundo alelo ¹¹⁴. Rampal y *col* demostraron, mediante un modelo murino, que la expresión de *JAK2V617F* combinado con la pérdida de *TP53* conducía a un cuadro compatible con LA *in vivo* ²²⁶. Más recientemente, otro grupo ha demostrado que los ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos *JAK2V617F/TP53^{-/-}* fallecían a los 46,5 días (mediana) post-trasplante en contraste con los ratones *JAK2V617F/TP53^{+/+}*, la mayoría de los cuales estaban sanos a los 120 días. Observaron que los ratones que habían sido transfectados con *JAK2V617F/TP53^{-/-}* habían desarrollado infiltración

leucémica con acumulación de eritroblastos, cuadro compatible con una eritroleucemia²²⁷.

Se han descrito mutaciones en otros genes que también estarían asociados a la transformación leucémica, como **IDH1/IDH2**, **IKZF1** y **RUNX1**^{228,229}.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las neoplasias mieloproliferativas *JAK2V617F* mutadas se caracterizan por la coexistencia de progenitores clonales *JAK2V617F* mutados y no mutados. El conocimiento de la carga mutacional de *JAK2V617F* y de las mutaciones *non-driver* a nivel de los progenitores hematopoyéticos podría proporcionar información sobre la base biológica de los cambios clínicos evolutivos, especialmente, la transformación a mielofibrosis y leucemia aguda. Asimismo, la carga mutacional a nivel progenitor también podría tener alguna influencia en la respuesta al tratamiento.

Algunos autores postulan que las NMP *CALR* mutadas son una entidad distinta de las *JAK2* mutadas, tanto desde el punto de vista biológico, como clínico y pronóstico. Estas observaciones podrían ser la consecuencia de un comportamiento diferente a nivel de los progenitores hematopoyéticos.

En este contexto, los objetivos que planteamos de los trabajos de investigación fueron los siguientes:

1. Caracterizar las subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos (CD34+CD38- y CD34+CD38+) y cuantificar la carga mutacional de dichas subpoblaciones en pacientes con PV.
2. Correlacionar la carga mutacional de *JAK2V617F* a nivel de los progenitores con la fase evolutiva de la enfermedad, la carga mutacional de *JAK2V617F* en los granulocitos y la presencia de mutaciones adicionales.
3. Determinar las diferencias en el tamaño del clon mutado de los progenitores hematopoyéticos según el genotipo *CALR* o *JAK2V617F*.
4. Investigar la influencia del tratamiento con inhibidores de *JAK2* en la evolución de la carga mutacional a nivel de los progenitores hematopoyéticos.

RESULTADOS

Trabajo 1.

Dominancia clonal, mutaciones en las *stem cells* y patrón evolutivo de *JAK2V617F* en la policitemia vera.

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: 251-7.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la carga mutacional de *JAK2V617F* en los progenitores hematopoyéticos de pacientes con PV y correlacionarla con la fase evolutiva de la enfermedad y con la presencia de mutaciones adicionales. La carga mutacional de *JAK2V617F* se cuantificó en CD34+CD38- (HSC), CD34+CD38+ (HPC) y granulocitos de 45 pacientes con PV (fase crónica temprana n=26, fase crónica tardía n =10, MF post-PV n = 9). Además, se hizo un *screening* de mutaciones adicionales (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*) en granulocitos y, en los casos con mutaciones, se cuantificó la carga mutacional a nivel de las células progenitoras. Por último, se evaluó si la determinación de la carga mutacional de *JAK2V617F* en granulocitos de sangre periférica puede ser útil para identificar aquellos pacientes que presentan dominancia clonal a nivel de los progenitores hematopoyéticos.

La cuantificación de *JAK2V617F* en las células CD34+CD38- de los pacientes con MF post-PV fue del 71%, frente al 27% y 12% en los pacientes con PV en fase crónica tardía y temprana respectivamente ($p < 0,001$). Se obtuvieron resultados similares en los progenitores hematopoyéticos CD34+CD38+. En cambio, la cuantificación de *JAK2V617F* en granulocitos no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes siendo del 77%, 72% y 60% en fase mielofibrosis, crónica tardía y crónica temprana, respectivamente. Ninguno de los 26 pacientes analizados en la fase crónica temprana mostró dominancia del clon *JAK2V617F* a nivel de los progenitores hematopoyéticos en comparación con el 10% de los pacientes analizados en fase crónica tardía y el 78% de los pacientes en fase de mielofibrosis.

Se detectaron mutaciones adicionales en 4 (9%) pacientes, 3 de ellos correspondían a fase crónica temprana y uno al grupo de mielofibrosis. Los genes mutados fueron *TET2* (n=3) y *DNMT3A* (n=1). Dos de los tres pacientes con mutaciones adicionales al diagnóstico presentaban dominancia del clon con mutación en *TET2* y *DNMT3A*, respectivamente. El análisis mutacional de las colonias eritroides obtenidas mediante cultivo permitió establecer el orden de adquisición de las mutaciones en 2 pacientes, ambos estudiados en fase crónica temprana. En uno de ellos la mutación de *TET2* precedió a la

adquisición de *JAK2V617F*, mostrando a su vez dominancia del clon *TET2*, mientras que en el otro paciente la mutación de *JAK2V617F* fue anterior a la de *TET2* siendo el único caso con mutación adicional que no mostraba dominancia clonal.

Finalmente, la cuantificación puntual de *JAK2V617F* en los granulocitos no resultó ser de utilidad para identificar correctamente la existencia de dominancia clonal a nivel de los progenitores hematopoyéticos. La determinación del patrón evolutivo de *JAK2V617F* mostró una alta sensibilidad, pero con una especificidad y valor predictivo positivo bajos.

En conclusión, la dominancia clonal a nivel de los progenitores hematopoyéticos puede estar presente al diagnóstico, especialmente en los pacientes con mutaciones adicionales.

Copia del Trabajo 1.

Se sustituye la copia del Trabajo 1 (correspondiente a las paginas 75-81 de la tesis) por su referencia bibliográfica para su incorporación al repositorio “Tesis Doctorales en Red”

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): 251-257.

Trabajo 2.

Caracterización de los progenitores hematopoyéticos CD34+ en las neoplasias mieloproliferativas *JAK2V617F* y *CALR* mutadas.

Angona A, Alvarez-Larrán, Bellosillo B, Longarón R, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Besses C. Characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in *JAK2V617F* and *CALR*-mutated myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* 2016.;48:11-15.

Resumen

Las mutaciones *JAK2V617F* y las del exón 9 del gen *CALR* son las alteraciones genéticas más frecuentes en las NMP Ph negativas. El objetivo del presente estudio fue comparar la proporción de progenitores hematopoyéticos mutados de acuerdo con el genotipo *CALR* o *JAK2V617F*. Para ello se cuantificó la carga mutacional de las células CD34+CD38- (HSC), CD34+CD38+ (HPC) y de los granulocitos de 138 pacientes: 51 PV (todas *JAK2* mutadas), 58 TE (35 *JAK2V617F* y 23 *CALR* mutadas) y 29 MF (20 *JAK2V617F* y 9 *CALR* mutadas). Los progenitores hematopoyéticos de los pacientes con TE *CALR*-mutada mostraron una carga mutacional más alta que los pacientes con TE *JAK2V617F*-mutada (HSC: 40% vs 7,5%, $p < 0,001$, HPC: 33% vs 8%, $p < 0,001$). En cuanto al genotipo *CALR*, no hubo diferencias significativas en la carga mutacional de las HSC entre los pacientes con TE y MF (40% vs 48%, $p = 0,1$). Por lo que respecta al genotipo *JAK2V617F*, los pacientes con TE mostraron una menor carga mutacional que los pacientes con PV, tanto de las HSC (7,5% versus 17%, $p = 0,002$) como de las HPC (8% versus 27%, $p < 0,001$) mientras que los pacientes en fase de mielofibrosis la dominancia clonal fue un hallazgo constante. En conclusión, la proporción de progenitores hematopoyéticos mutados es diferente de acuerdo con el genotipo de la NMP. Los progenitores hematopoyéticos de las NMP con genotipo *CALR* presentan una elevada carga mutacional tanto en la TE como en la MF.

Copia del Trabajo 2.

Se sustituye la copia del Trabajo 2 (correspondiente a las paginas 84-88 de la tesis) por su referencia bibliográfica para su incorporación al repositorio “Tesis Doctorales en Red”

Angona A, Alvarez-Larrán A*, Bellosillo B, Longarón R, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Besses C. *Characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in JAK2V617F and CALR-mutated myeloproliferative neoplasms*. Leuk Res 2016.;48:11-15.

Trabajo adicional.

Dinámica de la carga mutacional de *JAK2V617F* en las células progenitoras CD34+ en pacientes en tratamiento con ruxolitinib.

Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Longarón R, Fernández-Rodríguez C, Besses C. Dynamics of *JAK2V617F* allele burden of CD34+ haematopoietic progenitor cells in patients treated with ruxolitinib. *Br J Haematol* 2016; 172 (4): 639-42 .

Se adjunta el documento como Anexo (ver anexos).

Resumen

El tratamiento con Ruxolitinib ha demostrado reducir la esplenomegalia y mejorar la sintomatología de los pacientes con PV y MF, con un efecto limitado en la disminución de la carga mutacional a nivel de los granulocitos.

El objetivo del presente estudio fue analizar la evolución de la carga mutacional de *JAK2V617F* en las células CD34+CD38- (HSC), CD34+CD38+ (HPC) y en los granulocitos de 7 pacientes con NMP (PV n=4, MF secundarias n=3) durante los primeros 12 meses de tratamiento con dicho fármaco. En 5 pacientes se observó que la carga mutacional a nivel de las HSC se mantenía estable (> 50% y < 50% en 3 y 2 pacientes, respectivamente). Por el contrario, dos pacientes presentaron variaciones de la carga mutacional a este nivel: un aumento del 22 al 47% y un descenso del 54 al 27%. Con respecto al compartimento de células HPC, la carga mutacional se redujo a los 6 meses de tratamiento en 3 pacientes, pero ésta no se confirmó a los 12 meses. Finalmente, los granulocitos fueron la población que presentó menor modificación de la carga mutacional de *JAK2V617F* durante el tratamiento con ruxolitinib, sin que ningún paciente presentase respuesta molecular según los criterios ELN 2013.

Adicionalmente, se analizó la presencia de mutaciones adicionales (*TET2*, *DNMT3A*, *TP53*, *ASXL1*, *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*) que pudieran jugar un papel en la dinámica de la carga mutacional. Se hallaron 2 mutaciones en *TET2* (p.R1179fs y p.E1483X) en un paciente con PV. Se cuantificó, asimismo, la carga mutacional de ambas mutaciones, sin variaciones significativas en ninguna de las tres poblaciones celulares. Estos resultados sugieren que Ruxolitinib tiene un escaso efecto sobre la carga mutacional de *JAK2V617F* de las *stem cells*, células progenitoras y granulocitos.

DISCUSIÓN

Trabajo 1.

Dominancia clonal, mutaciones en las *stem cells* y patrón evolutivo de *JAK2V617F* en la policitemia vera.

En el presente estudio observamos que los pacientes en fase crónica tardía presentaban una mayor carga alélica de *JAK2V617F* en las células CD34+ que los pacientes en fase crónica temprana. Sin embargo, al comparar los pacientes en fase crónica tardía con los pacientes en fase de MF post-PV, la carga mutacional de *JAK2V617F* era muchísimo más alta en estos últimos, de tal forma que la dominancia clonal estaba presente en el 10% de los pacientes en fase crónica tardía, a diferencia del 80% de los pacientes en fase de MF post-PV. Teniendo en cuenta que el período entre el diagnóstico y el momento del estudio fue similar en pacientes en fase crónica tardía y en la MF post-PV, estos resultados apoyarían el hecho de que la aparición de MF post-PV no es sólo una cuestión de tiempo y, por lo tanto, otros factores deben estar involucrados como podría ser la pérdida de heterocigosidad de 9p24 (9pLOH) y la adquisición de mutaciones adicionales.

En este sentido, en el presente estudio se evaluó la presencia de mutaciones en *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*. Tres pacientes presentaron mutaciones en *TET2* y 1 en *DNMT3A*. De estos 4 pacientes, uno mostraba dominancia clonal de *JAK2V617F* y dos de *TET2* y *DNMT3A*, respectivamente. Un aspecto importante a destacar es que estos 3 pacientes presentaban la mutación adicional ya en el momento del diagnóstico y, en dos de ellos, pudimos demostrar la dominancia clonal en el diagnóstico. Por lo tanto, se podría especular que la dominancia clonal puede estar presente al inicio de la enfermedad, especialmente en aquellos casos en los que existen mutaciones adicionales a *JAK2V617F*.

En cuanto a la evolución clonal, se ha reportado que en la mayoría de casos con mutaciones en *TET2*, éstas se habían adquirido antes que *JAK2V617F*, mientras que en una minoría de pacientes la mutación *JAK2V617F* habría precedido a la de *TET2*^{146,195}. Para elucidar este aspecto, nos hemos centrado en los cuatro pacientes portadores de *JAK2V617F* y otras

mutaciones. A través de cultivo de colonias, pudimos determinar el orden clonal en 2 de los 4 pacientes. En uno de ellos la mutación de *JAK2* se adquirió antes que la de *TET2* mientras que en el otro paciente la mutación de *TET2* se adquirió previo a *JAK2V617F*. En los otros dos pacientes, no se pudo dilucidar la jerarquía clonal, si bien se demostró la existencia de recombinación mitótica de *JAK2V617F* con un claro predominio de colonias homocigotas. Es importante destacar que tres de estos cuatro pacientes presentaban dominancia clonal sugiriendo una ventaja proliferativa de los clones con mutaciones adicionales. Además, el único caso con mutación adicional que no presentaba dominancia clonal era precisamente aquel en el cual *JAK2V617F* había precedido a *TET2*. Estos resultados y los de otros autores sugieren que la presencia de más de una mutación y el orden de adquisición de las mismas en las HSC podría jugar un papel en el desarrollo de dominancia clonal y por tanto en el curso evolutivo de la PV ^{80,146,195}.

En los pacientes con MF post-PV hemos observado una media de carga mutacional de *JAK2V617F* > 70% tanto en HSC, HPC como en granulocitos, de tal forma que el 78% de los pacientes presentaban dominancia del clon *JAK2V617F*. Sin embargo, tan solo 1 paciente con MF post-PV presentaba mutaciones adicionales. Estos hallazgos sugieren que en la MF post-PV la 9pLOH juega un papel más importante en el desarrollo de dominancia clonal que las mutaciones adicionales. Por tanto, el desarrollo de dominancia clonal debido a la presencia de mutaciones adicionales podría tener un significado clínico y pronóstico diferente. En este sentido, Lundberg y *col* reportaron la presencia de mutaciones adicionales en el 37% de pacientes con PV mediante análisis de panel NGS con 104 genes, presentando estos pacientes un mayor riesgo de transformación a LA ¹⁴⁶.

Una limitación del presente estudio es la baja frecuencia de mutaciones adicionales detectadas, que contrasta con el 37% - 62% reportada por otros grupos ^{81,146}. Asimismo, se ha descrito una mediana de 6,5 mutaciones por paciente con PV mediante secuenciación del exoma ⁴³. Esta baja frecuencia de mutaciones detectadas en nuestra serie puede deberse a aspectos metodológicos ya que no todos los genes fueron estudiados mediante NGS. En concreto, las mutaciones en *TET2* y *DNMT3A* se analizaron mediante

secuenciación *Sanger*, una técnica que requiere la presencia de la mutación en una carga superior al 10-20% para ser detectada. Además, en la técnica empleada se seleccionaron los exones con mayor frecuencia de mutaciones mientras que en los otros trabajos se analizó la totalidad de los exones ^{43,81,146}. Por otro lado, en nuestro estudio se analizaron un total de 7 genes, un número muy inferior al de otros estudios en los que se ha reportado una mayor prevalencia de mutaciones ^{43,81,146}.

La identificación de dominancia clonal o de mutaciones adicionales no está disponible en la práctica diaria. Por ello, sería de una gran utilidad disponer de una herramienta capaz de identificar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de presentar dominancia clonal o mutaciones adicionales. Para ello, utilizamos curvas ROC para determinar si la carga mutacional de *JAK2V617F* en los granulocitos podría constituir un marcador de dominancia clonal. En este sentido, tanto la determinación puntual de *JAK2V617F* en un momento puntual como la monitorización de *JAK2V617F* durante la evolución de la enfermedad demostraron una baja especificidad para predecir la presencia de dominancia clonal. Esta baja especificidad se explicaría por la existencia de un elevado número de casos con *JAK2V617F* persistentemente elevado o con un patrón evolutivo cambiante en los que no se existía dominancia clonal de *JAK2V617F* en los progenitores hematopoyéticos.

En conclusión, el porcentaje de células CD34+ con mutación V617F del gen *JAK2* en los pacientes con PV aumenta durante la evolución de la enfermedad. En la MF post-PV existe un predominio de progenitores hematopoyéticos *JAK2V617F* mutados probablemente como consecuencia de la expansión de los clones homocigotos. En el momento del diagnóstico de la PV puede existir hematopoyesis clonal debido a la expansión de clones con mutaciones adicionales.

Trabajo 2.

Caracterización de los progenitores hematopoyéticos CD34+ en las neoplasias mieloproliferativas *JAK2V617F* y *CALR* mutadas.

Alrededor del 90% de los pacientes con MPN son portadores de al menos una mutación somática, siendo *JAK2V617F* la más frecuente (69%), seguido de las mutaciones en el exón 9 del gen *CALR* (15%)¹⁴⁶. En el presente estudio hemos evaluado la carga mutacional de los progenitores hematopoyéticos (HSC y HPC) y granulocitos de 138 pacientes MPN. Los hallazgos principales fueron la demostración de una carga mutacional significativamente más alta a nivel de progenitor en la TE con genotipo *CALR* que en la TE *JAK2V617F*-mutada. Además, los pacientes con NMP con genotipo *CALR* presentaron una carga mutacional similar tanto en la TE como en la MF.

Se ha propuesto que la PV y la TE con mutación en *JAK2V617F* representan un espectro biológico de la misma enfermedad modulada por diferentes factores tanto adquiridos como constitucionales¹⁰¹. Así, la presencia de colonias *JAK2V617F* homocigotas es un hallazgo constante en la PV pero rara vez se observa en la TE⁵⁹. Por otra parte, Godfrey y *col*, utilizando la PCR de microsatélites para estudiar la pérdida de heterocigosidad, han observado que la PV está asociada con la expansión de un clon homocigoto dominante⁵⁷. Además, se han descrito otros factores que podrían participar en la adquisición de un fenotipo particular incluyendo el polimorfismo HBS1L-MYB (rs9376092)⁸⁵, un defecto en la fosforilación de STAT1¹⁰⁶ y el orden de adquisición de mutaciones adicionales⁸⁰.

En el presente trabajo hemos observado un aumento de la carga mutacional de *JAK2V617F* a nivel de los progenitores hematopoyéticos de acuerdo con el fenotipo, siendo mayor en los pacientes con PV en comparación con los pacientes con TE, resultados similares a los obtenidos por otros grupos^{67,68}. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados de los estudios murinos transgénicos que representaron la primera evidencia de que el nivel de expresión de *JAK2V617F* influía en el fenotipo de NMP⁹⁰⁻⁹². Por otra parte,

cuando analizamos los pacientes con MF *JAK2* mutados observamos que la carga mutacional a nivel progenitor era mayor del 50% en la mayoría de ellos, indicando, por lo tanto, un alto porcentaje de pacientes con dominancia clonal, resultados superponibles a los obtenidos en otras series de pacientes^{67,68}. Todos estos datos apoyan la hipótesis que la TE y PV representan un espectro biológico de una misma enfermedad y que la MF sería un evento tardío.

A finales del año 2013, el descubrimiento de mutaciones en el exón 9 del gen *CALR* en la mayoría de pacientes con TE y MF *JAK2* y *MPL* negativas supuso un gran avance en el conocimiento molecular de estas enfermedades, caracterizando un grupo de pacientes con TE con diferencias clínicas y biológicas respecto los pacientes con mutación de *JAK2*^{43,44}. En primer lugar, y de acuerdo con el hecho de que *JAK2V617F* – en contraste con *CALR* - activa no solamente la línea megacariocítica, sino también la eritroide y la granulocítica, los pacientes con TE *JAK2* mutados presentan una hemoglobina y leucocitos superiores y una cifra de plaquetas inferior en comparación con los pacientes *CALR* mutados^{157–162}. Asimismo, se ha descrito un riesgo inferior de complicaciones trombóticas en los pacientes con mutación de *CALR* en comparación con los *JAK2* mutados^{44,157,158,161}. Por otro lado, otros autores postulan diferencias también a nivel molecular entre estas dos entidades. Así, mediante análisis de PICX, se ha descrito clonalidad en el 88% y 26% de pacientes con mutación de *CALR* y *JAK2V617F*, respectivamente¹⁶⁴. Además, existe una gran diferencia entre estos dos grupos de pacientes en cuanto a la carga mutacional de los granulocitos que representa aproximadamente el 15% en la TE *JAK2* mutada en comparación con el 40% en la TE *CALR* mutada¹⁵⁷. En este sentido, en nuestro estudio pudimos demostrar también diferencias estadísticamente significativas en la carga mutacional de los progenitores hematopoyéticos en los pacientes con TE de acuerdo con el genotipo, siendo superior en los pacientes *CALR* mutados respecto los pacientes con mutación *JAK2V617F*. Este hallazgo apunta, por tanto, a una mayor ventaja proliferativa de las mutaciones de *CALR* a nivel de las HSC en comparación con la mutación *JAK2V617F*, dato que apoyaría que se trataría de dos entidades distintas. Algunos autores han descrito que la adquisición de la mutación *JAK2V617F* es un evento tardío mientras que las mutaciones de *CALR* son

típicamente eventos iniciales ⁴³, un hallazgo que también podría justificar la diferente carga mutacional observada a nivel de los progenitores entre ambos genotipos.

De forma interesante, cuando comparamos la carga mutacional a nivel de las células CD34+ entre los pacientes con TE y MF *CALR* mutados, no hallamos diferencias estadísticamente significativas. La existencia de un clon mutado expandido a nivel progenitor en los pacientes con TE con mutación de *CALR* indicaría que la TE y MF *CALR* mutada constituirían, a su vez, un continuo de una misma enfermedad. En este sentido, y de acuerdo con esta hipótesis, se han descrito más características clínicas MF-*like* (hemoglobina inferior, LDH superior) y una mayor probabilidad de transformación a MF en los pacientes con TE *CALR* mutados en comparación con aquellos *JAK2V617F* ^{157,158,160–162}. Por último, la histología de la médula ósea también es diferente de acuerdo con el genotipo siendo las anomalías en los megacariocitos más frecuentes en la TE *CALR* mutada que en la TE *JAK2V617F* ¹⁶⁵.

Marty y col, mediante un modelo murino retroviral pudieron demostrar que los ratones con mutación de *CALR* tipo 1 presentaban mayor probabilidad de progresión a MF y aquellos con mutación tipo 2 un cuadro clínico más próximo a TE ¹⁵². Algunos autores observan estas diferencias en el fenotipo y comportamiento clínico de los pacientes con TE y mutación del gen de la *CALR*, según el tipo de mutación que presenten ¹⁵⁶. En nuestro subgrupo de pacientes con TE *CALR* mutada no encontramos diferencias en la carga mutacional a nivel progenitor de acuerdo con el tipo de mutación de *CALR*, si bien hay que tener en cuenta que el número de pacientes analizados es bajo.

Respecto a los pacientes con MF, pudimos demostrar la presencia de dominancia clonal en la mayoría de pacientes con mutación V617F de *JAK2*, de acuerdo con otros grupos ^{67,68} y, asimismo, en la mayoría de pacientes *CALR* mutados.

Un punto importante a destacar es que la carga mutacional de *JAK2V617F* aumenta de forma progresiva durante la hematopoyesis, de tal forma que las HSC mostraban una carga mutacional baja, las HPC mostraron

una carga intermedia y los granulocitos la más alta. Esta observación era muy manifiesta en la PV y, en menor grado, en la TE. En cambio, en el genotipo *CALR* la carga mutacional fue similar en las tres poblaciones celulares estudiadas (en torno al 35-40%) por lo que, asumiendo la presencia de la mutación en estado heterocigoto, indica que la mayoría de células son portadoras de la mutación. De estos resultados se puede concluir que los progenitores *JAK2V617F*-mutados tienen una capacidad de diferenciación superior a los progenitores normales mientras que los progenitores portadores de la mutación *CALR* producen una supresión de la hematopoyesis normal.

Finalmente, otro hallazgo del presente estudio fue el aumento progresivo de la carga mutacional tanto de *JAK2V617F* como de *CALR* en las tres poblaciones durante la evolución de la enfermedad. Es importante destacar que en los pacientes con NMP *CALR* mutadas la dominancia clonal se mantenía estable durante el seguimiento, sugiriendo una proliferación continua de las clonas mutadas.

En conclusión, la proporción de progenitores mutados es diferente de acuerdo con el genotipo de la NMP. Los pacientes con mutación de *CALR* se caracterizan por una expansión de los progenitores mutados, mientras que los pacientes con TE y PV *JAK2V617F* presentan un pequeño porcentaje de progenitores mutados con una alta capacidad de diferenciación.

Trabajo adicional

Dinámica de la carga mutacional de *JAK2V617F* en las células progenitoras CD34+ en pacientes en tratamiento con ruxolitinib.

El desarrollo de terapias dirigidas a inhibir *JAK2* ha supuesto una nueva era en el tratamiento de las NMP Ph negativas. Ruxolitinib ha sido el primer inhibidor de *JAK2* aprobado en PV y MF, ha mostrado eficacia en la mejoría de la sintomatología y de la esplenomegalia en los pacientes con PV y MF ^{131,132,135,231}. No obstante, su capacidad en inducir respuestas moleculares es escasa, sugiriendo que no actuaría únicamente sobre las células *JAK2* mutadas, tal y como se demuestra por la limitada reducción de la carga mutacional de *JAK2V617F* en los granulocitos durante el tratamiento ^{133,134,137}. Asimismo, otro aspecto que indica que su acción no es exclusivamente sobre las células *JAK2* mutadas es la mejoría sintomática que también presentan los pacientes con mutaciones en *CALR* y *MPL* ¹⁶⁹. En el presente estudio demostramos que ruxolitinib tenía un mínimo impacto en reducir la carga mutacional de *JAK2V617F* en los granulocitos, pero también en las células CD34+, sugiriendo una ausencia de capacidad de erradicar la clona neoplásica, resultados que apoyan la evidencia obtenida en modelos murinos y en pacientes con MF ^{98,232}.

Una primera observación de nuestra serie es que seis de los 7 pacientes presentaban esplenomegalia previa al inicio del tratamiento, y en todos ellos pudimos demostrar una reducción de la misma durante el seguimiento. Esta mejoría clínica sin reducción de la carga mutacional a nivel progenitor podría explicarse por diferencias de los progenitores hematopoyéticos en el microambiente entre el bazo y la médula ósea, siendo los progenitores esplénicos más sensibles al tratamiento. Así, Wang y *col* han demostrado que AZD1480, un inhibidor de *JAK1/2/3* es capaz de inducir apoptosis en las células progenitoras esplénicas de pacientes con MF, con la consiguiente reducción de la esplenomegalia ²³².

Se ha postulado que la adquisición de mutaciones *non-driver* adicionales a *JAK2V617F* puede tener un papel en la progresión de la enfermedad y,

probablemente, conllevar una respuesta molecular al tratamiento citorreductor diferente al esperado ^{112,230}. Un paciente con PV de nuestra cohorte presentaba, adicionalmente a *JAK2V617F*, dos mutaciones en el gen *TET2*. Durante el tratamiento con ruxolitinib no pudimos demostrar una disminución de la carga mutacional de ninguna de las 3 mutaciones ni en las HSC, HPC ni en los granulocitos. En este sentido, especulando que ruxolitinib tuviera algún impacto a nivel progenitor, éste sería diferente según si las mutaciones de *JAK2* y *TET2* coexistieran en una misma clona o en dos clones distintas. En el primer caso, sería esperable que si ruxolitinib inhibiera *JAK2* también tendría algún efecto en la carga mutacional de *TET2*. Por el contrario, en el segundo caso, la inhibición de *JAK2* podría conllevar una ventaja proliferativa a la clona *TET2*, con su consiguiente expansión. Asimismo, también se ha descrito que el orden de adquisición de las mutaciones puede tener impacto en la respuesta al tratamiento, siendo los progenitores de los pacientes *JAK2*-first más sensibles a ruxolitinib respecto a los de pacientes *TET2*-first ⁸⁰. En este sentido, y a pesar de que en el paciente previamente descrito pudimos describir mediante cultivo de colonias que la mutación de *JAK2V617F* se había adquirido antes que *TET2*, no observamos ningún efecto de ruxolitinib en la carga mutacional de ninguna de las 3 mutaciones.

En conclusión, el tratamiento con ruxolitinib conlleva mejoría clínica y reducción de la esplenomegalia en una proporción importante de pacientes, tal y como se ha demostrado en ensayos clínicos, pero tiene una capacidad limitada en modificar la clona neoplásica.

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de células CD34+ con mutación V617F del gen *JAK2* en los pacientes con PV aumenta durante la evolución de la enfermedad.
2. En la MF post-PV existe un predominio de progenitores hematopoyéticos *JAK2V617F* mutados probablemente como consecuencia de la expansión de los clones homocigotos.
3. En el momento del diagnóstico de la PV puede existir hematopoyesis clonal debido a la expansión de clones con mutaciones adicionales
4. La proporción de progenitores hematopoyéticos mutados es diferente de acuerdo con el genotipo de la NMP.
5. Los pacientes con mutación de *CALR* se caracterizan por una expansión de los progenitores mutados, mientras que los pacientes con TE y PV *JAK2V617F* presentan un pequeño porcentaje de progenitores mutados con una alta capacidad de diferenciación.
6. El tratamiento con Ruxolitinib tiene escasa capacidad de modificar la carga mutacional de *JAK2V617F* en las células CD34+ en los pacientes con PV y MF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21(1):759-806.
2. Pang WW, Price EA, Sahoo D, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(50):20012-20017.
3. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002;21(21):3295-3313.
4. Koury MJ. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol* 1992;20(4):391-394.
5. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
6. Fina L, Molgaard H V, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75(12):2417-2426.
7. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994;84(3):691-701.
8. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993;262(5132):436-438.
9. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;84(8):2554-2565.
10. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*. 1992;1(2):115-129.
11. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, et al. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 1993;81(4):1001-1008.

12. Fackler MJ, Civin CI, May WS. Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J Biol Chem* 1992;267(25):17540-17546.
13. Majdic O, Stöckl J, Pickl WF, et al. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood* 1994;83(5):1226-1234.
14. Srour EF, Brandt JE, Briddell RA, Leemhuis T, Van Besien K, Hoffman R. Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells* 1991;17(2):287-295.
15. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993;82(9):2664-2672.
16. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(7):2804-2808.
17. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177(5):1331-1342.
18. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995;86(10):3745-3753.
19. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(10):5320-5325.
20. Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):413-418.

21. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 2007;1(6):635-645.
22. Hoffbrand V MP. Haematology. Hoffbrand's essential. *Seventh Edition*. Wiley Blackwell 2016.
23. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science* 1987;238(4832):1374-1379.
24. Han ZC, Caen JP. Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. *Baillière's Clin Haematol* 1994;7(1):65-89.
25. Hogge DE, Sutherland HJ, Cashman JD, Lansdorp PM, Humphries RK, Eaves CJ. Cytokines acting early in human haematopoiesis. *Baillière's Clin Haematol* 1994;7(1):49-63.
26. Veiby OP, Mikhail AA, Snodgrass HR. Growth factors and hematopoietic stem cells. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997;11(6):1173-1184.
27. Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 2005;24(37):5676-5692.
28. Pronk CJH, Veiby OP, Bryder D, Jacobsen SEW. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med* 2011;208(8):1563-1570.
29. Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004;41(2 Suppl 3):1-5.
30. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-2405.
31. Dameshek. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6(4):372-376.
32. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974;290(24):1382.

33. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernández-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients. *N Engl J Med* 1998; 338(9): 564-571.
34. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295(17):913-916.
35. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30(3):229-236.
36. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-1148.
37. 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.
38. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M SR. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352(17):1779-1790.
39. 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.
40. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280(24):22788-22792.
41. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459-468.
42. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.

43. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391-2405.
44. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of Calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379-2390.
45. 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.
46. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 2009;228(1):273-287.
47. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20(10):3387-3395.
48. 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.
49. Remy I. Erythropoietin Receptor Activation by a Ligand-Induced Conformation Change. *Science* 1999;283(5404):990-993.
50. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74(2):227-236.
51. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, VonDerLinden D, Sayeski PP. Jak2 Tyrosine Kinase: A True Jak of All Trades? *Cell Biochem Biophys* 2004;41(2):207-232.
52. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler C. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285(1-2):1-24.
53. 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.
54. 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. *Exp Hematol* 2002;30(9):990-1000.
 55. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004;32(2):179-187.
 56. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006;108(7):2173-2181.
 57. Godfrey AL, Chen E, Pagano F, et al. JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood* 2012;120(13):2704-2707.
 58. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998;93(3):397-409.
 59. 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.
 60. Florensa L, Bellosillo B, Besses C, et al. JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. *Leukemia* 2006;20(10):1903-1905.
 61. Jamieson CHM, Gotlib J, Durocher J a, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(16):6224-6229.

62. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2 V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006;108(9):3128-3134.
63. 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.
64. Dupont S, Massé A, James C, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;110(3):1013-1021.
65. Gale RE, Allen AJR, Nash MJ, Linch DC. Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for many years. *Blood* 2007;109(3):1241-1243.
66. Anand S, Stedham F, Beer P, et al. Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118(1):177-181.
67. Stein BL, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL, Moliterno AR. Disease burden at the progenitor level is a feature of primary myelofibrosis: a multivariable analysis of 164 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasm patients. *Exp Hematol* 2011;39(1):95-101.
68. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability with the JAK2 V617F-positive MDP: the roles of progenitor cell and neutrophil allele budens. *Exp Hematol* 2008;36(11):1480-1486.
69. Ishii T, Zhao Y, Sozer S, et al. Behavior of CD34+ cells isolated from patients with polycythemia vera in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2007;35(11):1633-1640.
70. 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.

71. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371(26):2477-2487.
72. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371(26):2488-2498.
73. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014;20(12):1472-1478.
74. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica* 2014;99(9):1448-1455.
75. Mullally A, Poveromo L, Schneider RK, Al-Shahrour F, Lane SW, Ebert BL. Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood* 2012;120(1):166-172.
76. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood* 2013;122(8):1464-1477.
77. Bellanné-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.
78. Kralovics R, Teo S-S, 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.
79. Theocharides 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.

80. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2015;372(7):601-612.
81. Delic S, Rose D, Kern W, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2016;175(3):419-426.
82. Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, et al. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature* 2014;512(7512):78-81.
83. Desterke C, Bilhou-Nabéra C, Guerton B, et al. FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. *Cancer Res* 2011;71(8):2901-2915.
84. Mager LF, Riether C, Schürch CM, et al. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest* 2015;125(7):2579-2591.
85. Tapper W, Jones A V., Kralovics R, et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun* 2015;6:6691.
86. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006;107(11):4274-4281.
87. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2 V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006;108(5):1652-1660.
88. Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, et al. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One* 2006;1(1). e18.

89. Bumm TGP, Elsea C, Corbin AS, et al. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* 2006;66(23):11156-11165.
90. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008;111(8):3931-3940.
91. Xing S, Wanting TH, Zhao W, et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood* 2008;111(10):5109-5117.
92. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, et al. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia* 2008;22(1):87-95.
93. Xu M, Bruno E, Chao J, et al. The constitutive mobilization of bone marrow – repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2005;105(4):1699-1705.
94. Wang X, Prakash S, Lu M, et al. Spleens of myelofibrosis patients contain malignant hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2012;122(11):3888-3899.
95. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(22):2289-2301.
96. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 2010;115(17):3589-3597.
97. Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 2010;116(5):783-787.
98. Mullally A, Lane SW, Ball B, et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on

- hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell* 2010;17(6):584-596.
99. Li J, Spensberger D, Ahn JS, et al. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F – positive essential thrombocythemia. *Blood* 2010;116(9):1528-1538.
 100. Li J, Kent DG, Godfrey AL, et al. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood* 2014;123(20):3139-3151.
 101. 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.
 102. Nangalia J, Griffin J, Green AR. Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders. *Annu Rev Pathol* 2016;11:101-126.
 103. Tiong IS, Casolari DA, Nguyen T, et al. Masked polycythaemia vera is genetically intermediate between JAK2V617F mutated essential thrombocythaemia and overt polycythaemia vera. *Blood Cancer J* 2016;6(8):e459.
 104. 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.
 105. 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.
 106. 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.
 107. Godfrey AL, Chen E, Pagano F, Silber Y, Campbell PJ, Green AR. Clonal analyses reveal associations of JAK2V617F homozygosity with

- hematologic features, age and gender in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2013;98(5):718-721.
108. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41(4):455-459.
 109. Jones A V, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41(4):446-449.
 110. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41(4):450-454.
 111. Soler G, Bernal-Vicente A, Antón AI, et al. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2015;94(5):789-794.
 112. 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.
 113. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2010;362(4):369-370.
 114. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med* 2011;364(5):488-490.
 115. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861-1869.
 116. Jutzi JS, Bogeska R, Nikoloski G, et al. MPN patients harbor recurrent truncating mutations in transcription factor NF-E2. *J Exp Med* 2013;210(5):1003-1019.
 117. 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.
118. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol* 2009;146(5):504-509.
 119. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2009;37(9):1016-1021.
 120. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 2010;24(9):1574-1579.
 121. 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. *Am J Hematol* 2014;89(5):517-523.
 122. 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):324-326.
 123. Besses C, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, et al. Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol* 2011;152(4):413-419.
 124. Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, et al. Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. *Haematologica* 2008;93(11):1723-1727.
 125. Spanoudakis E, Bazdiara I, Kotsianidis I, et al. Hydroxyurea (HU) is effective in reducing JAK2V617F mutated clone size in the peripheral

- blood of essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) patients. *Ann Hematol* 2009;88(7):629-632.
126. Ricksten A, Palmqvist L, Johansson P, Andreasson B. Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93(8):1260-1261.
 127. Angona A, Bellosillo B, Alvarez-Larrán A, et al. Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamide. *Leuk Res* 2013;37(8):917-921.
 128. 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.
 129. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Pegylated Interferon Alfa-2a Yields High Rates of Hematologic and Molecular Response in Patients With Advanced Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *J Clin Onco.* 2009;27(32):5418-5424.
 130. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P et al. Final results from PROUD-PV a randomized controlled phase 3 trial comparing ropeginterferon alfa-2b to hydroxyurea in polycythemia vera patients. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego 2016. *Blood* 2016. Abstract 475.
 131. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(9):799-807.
 132. Harrison C, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, et al. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(9):787-798.
 133. Deininger M, Radich J, Burn TC, Huber R, Paranagama D, Verstovsek S. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015;126(13):1551-1554.

134. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian J-J, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* 2016;30(8):1701-1707.
135. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Grieshammer M, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 2015;372(5):426-435.
136. Passamonti F, Grieshammer M, Palandri F, et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet Oncol* 2017;18(1):88-99.
137. Verstovsek S, Vannucchi AM, Grieshammer M, et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. *Haematologica* 2016;101(7):821-829.
138. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshouri T, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α -2a. *Blood* 2013;122(6):893-901.
139. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011;117(10):2813-2816.
140. 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.
141. 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.
142. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* 2008;111(7):3863-3866.
143. 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.
144. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009;417(3):651-666.
 145. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(6):842-846.
 146. 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.
 147. 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.
 148. 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;28(9):1912-1914.
 149. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015;29(1):249-252.
 150. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016;127(10):1307-1316.
 151. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* 2016;127(10):1325-1335.
 152. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* 2015;127(10):1317-1324.

153. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant Calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov* 2016;6(4):368-381.
154. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006;107(5):1864-1871.
155. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017;129(6): 667-679.
156. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2016;30(2):431-438.
157. 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* 2014;123(10):1544-1551.
158. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of Calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123(10):1552-1555.
159. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014;124(16):2507-2513.
160. AL Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, et al. Analysis of Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica* 2015;100(7):893-897.
161. Gangat N, Wassie E a, Lasho TL, et al. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history. *Eur J Haematol* 2015;94(1):31-36.
162. Palandri F, Latagliata R, Polverelli N, et al. Mutations and long-term

- outcome of 217 young patients with Essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. *Leukemia* 2015;29(6): 1344-1349.
163. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Guglielmelli P, et al. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*.2016;101(8):926-931.
 164. 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.
 165. 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. *Br J Haematol* 2014;166(6):911-919.
 166. Loghavi S, Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, et al. Myeloproliferative Neoplasms With Calreticulin Mutations Exhibit Distinctive Morphologic Features. *Am J Clin Pathol* 2016;145(3):418-427.
 167. 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.
 168. Stein H, Bob R, Dürkop H, et al. A new monoclonal antibody (CAL2) detects CALRETICULIN mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded bone marrow biopsies. *Leukemia* 2016;30(1):131-135.
 169. Guglielmelli P, Rotunno G, Bogani C, et al. Ruxolitinib is an effective treatment for CALR-positive patients with myelofibrosis. *Br J Haematol* 2016;173(6):938-940.
 170. Verger E, Cassinat B, Chauveau A, et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* 2015;126(24):2585-2591.
 171. Bellosillo B, Longaron R, Pairet S et al. Dynamics of CALR mutant allele burden in essential thrombocythemia patients. 19th Congress of the

- European Hematology Association. Milan, junio 2014. Abstract P413.
172. Kjær L, Cordua S, Holmström MO, et al. Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. Mills K, ed. PLoS One 2016;11(10):e0165336.
 173. Tefferi A, Cervantes F, Mesa R, et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. Blood 2013;122(8):1395-1398.
 174. 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.
 175. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative essential thrombocythemia patients. Blood 2016; 127(3): 333-342.
 176. Milosevic-Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood 2016;127(3):325-332.
 177. 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.
 178. 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. Br J Haematol 2006;135(5):683-687.
 179. 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.
 180. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, et al. Clinical utility of routine

- MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 2010;149(2):250-257.
181. Chaligné 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.
 182. Chaligné 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.
 183. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* 2007;137(3):244-247.
 184. 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.
 185. Rudd CE. Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Sci STKE* 2001;2001(85):pe1.
 186. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 2005;105(12):4604-4612.
 187. 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.
 188. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* 2002;195(12):1599-1611.
 189. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. 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.

190. Schmidt MHH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(12):907-918.
191. 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.
192. Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466(7310):1129-1133.
193. 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.
194. Globisch D, Münzel M, Müller M, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* 2010;5(12):e15367.
195. 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.
196. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011;20(1):11-24.
197. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011;20(1):25-38.
198. Li Z, Cai X, Cai C-L, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 2011;118(17):4509-4518.
199. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(35):14566-14571.

200. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012;44(11):1179-1181.
201. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015;125(2):327-335.
202. Kameda T, Shide K, Yamaji T, et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood* 2015;125(2):304-315.
203. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011;25(7):1219-1220.
204. Thol F, Damm F, Lüdeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29(21):2889-2896.
205. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2011;44(1):23-31.
206. Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, Godfrey AL, Grinfeld J, Thakker C, Massie CE, Baxter J, Sewell D, Silber Y, Campbell PJ GA. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica* 2015;100(11):438-442.
207. Xu J, Wang Y-Y, Dai Y-J, et al. DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(7):2620-2625.
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. *Br J Haematol* 2009;145(6):788-800.
210. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 2013;210(12):2641-2659.
211. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010;42(8):722-726.
212. Makishima H, Jankowska AM, Tiu R V, et al. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 2010;24(10):1799-1804.
213. 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.
214. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* 2011;118(19):5227-5234.
215. Muto T, Sashida G, Oshima M, et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 2013;210(12):2627-2639.
216. Shimizu T, Kubovcaková L, Nienhold R, et al. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2 -V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *J Exp Med* 2016;213(8):1479-1496.
217. 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.
218. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative

- neoplasms. *Leukemia* 2010;24(6):1146-1151.
219. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478(7367):64-69.
 220. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med* 2011;365(15):1384-1395.
 221. 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.
 222. 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.
 223. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 2012;120(15):3080-3088.
 224. Zhang S-J, Rampal R, Manshour 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.
 225. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia* 2014;28(2):431-433.
 226. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(50):E5401-E5410.
 227. Tsuruta-Kishino T, Koya J, Kataoka K, et al. Loss of p53 induces leukemic transformation in a murine model of Jak2 V617F-driven

polycythemia vera. *Oncogene* 2017. Epub ahead of print.

228. Courtier F, Carbuccia N, Garnier S, et al. Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica* 2017;102(1):e11-e14.
229. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2012;87(11):1010-1016.
230. Swierczek SI, Yoon D, Bellanné-Chantelot C, et al. Extent of hematopoietic involvement by TET2 mutations in JAK2V⁶¹⁷F polycythemia vera. *Haematologica* 2011;96(5):775-778.
231. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer* 2014;120(4):513-520.
232. Wang X, Ye F, Tripodi J, et al. JAK2 inhibitors do not affect stem cells present in the spleens of patients with myelofibrosis. *Blood* 2014;124(19):2987-2995.

ANEXO

Anexo 1.

Copia del trabajo adicional.

Se sustituye la copia del Trabajo adicional (correspondiente a las paginas 131-134 de la tesis) por su referencia bibliográfica para su incorporación al repositorio "Tesis Doctorales en Red"

Angona A, Alvarez-Larrán A*, Bellosillo B, Longarón R, Fernández-Rodríguez C, Besses C. *Dynamics of JAK2V617F allele burden of CD34+ haematopoietic progenitor cells in patients treated with ruxolitinib*. Br J Haematol 2016; 172 (4): 639-642 .