



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

REPRODUCIBILIDAD DE LOS CRITERIOS DE LA OMS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA POLICITEMIA VERA

Tesis doctoral presentada por:

Agueda Ancochea Serra

Directores de tesis:

Alberto Álvarez Larrán

Carlos Besses Raebel

Tutor de tesis:

Jorge Sierra Gil

Tesi adscrita al Programa de Doctorat de Medicina.

Mayo, 2017

A mis padres, a Lluís y a Maria

ÍNDICE

Agradecimientos

Abreviaturas

1. Introducción

- 1.1 Introducción general
- 1.2 Historia y etiopatogenia de la PV
- 1.3 Epidemiología y manifestaciones clínicas de la PV
- 1.4 Parámetros bioquímicos, de hematimetría y otros datos de laboratorio
 - 1.4.1 Masa eritrocitaria, hemoglobina y hematocrito.
 - 1.4.2 Leucocitos, plaquetas.
 - 1.4.3 Pruebas bioquímicas
 - 1.4.4 Eritropoyetina
 - 1.4.5 Cultivos de colonias eritroides
 - 1.4.6 Citogenética
 - 1.4.7 Biología molecular
 - 1.4.8 Sangre periférica, aspirado y biopsia de médula ósea
- 1.5 Criterios diagnósticos
 - 1.5.1 Polycythemia Vera Study Group
 - 1.5.2 Criterios OMS: 2001, 2008, 2016
 - 1.5.3 Criterios BSCH
- 1.6 Diagnóstico diferencial
- 1.7 Evolución y pronóstico
- 1.8 Tratamiento

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

3. Resultados

- 3.1 Trabajo 1. Papel de la EPO sérica y de la carga alélica de *JAK2V617F* en el diagnóstico de la policitemia vera.
 - 3.1.1 Resumen
 - 3.1.2 Copia del artículo
- 3.2 Trabajo 2. Criterios histológicos OMS de las neoplasias mieloproliferativas: reproducibilidad, exactitud diagnóstica y correlación con las mutaciones genéticas y la evolución clínica.
 - 3.2.1 Resumen
 - 3.2.2 Copia del artículo
- 3.3 Trabajo adicional. Medición de la masa eritrocitaria en pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de policitemia vera o trombocitemia esencial.
 - 3.3.1 Resumen
 - 3.3.2 Copia del artículo

4. Discusión

- 4.1 Trabajo 1. Papel de la EPO sérica y de la carga alélica de *JAK2V617F* en el diagnóstico de la policitemia vera.
- 4.2 Trabajo 2. Criterios histológicos OMS de las neoplasias mieloproliferativas: reproducibilidad, exactitud diagnóstica y correlación con las mutaciones genéticas y la evolución clínica.
- 4.3 Trabajo adicional. Medición de la masa eritrocitaria en pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de policitemia vera o trombocitemia esencial.

5. Conclusiones

Anexo 1. Trabajo adicional: Medición de la masa eritrocitaria en pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de policitemia vera o trombocitemia esencial.

Anexo 2. Precisión diagnóstica de los valores de corte de hemoglobina y hematocrito de la OMS 2016.

6. Bibliografía

AGRADECIMIENTOS

Voldria agrair al Dr. Besses, els seus consells, la seva paciència i la seva confiança, així com totes les oportunitats d'aprendre que m'ha ofert.

Al Dr. Álvarez Larrán, mai no li estaré prou agraïda, per confiar sempre en mi, per entendre'm i per la seva gran capacitat docent, per preocupar-se per nosaltres i per tots els grans moments que hem viscut al seu costat, per introduir la música al nostre món i per ser una persona tan autèntica.

A la Dra. Abella, per ser com una super mami, per preocupar-se per nosaltres, per la seva alegria contagiosa, i per tot el què ens ha ensenyat dia rere dia.

A la Dra. Gimeno, per la seva pau que contagia a tot el seu entorn, per la seva ajuda i comprensió i per estar sempre disposada a escoltar-nos.

A la Dra. Sánchez, per la seva amabilitat i generositat, per la seva confiança i per donar-me l'oportunitat d'aprendre al seu costat.

Al Dr. Salar, la Dra. Jiménez, la Dra. Pedro, per tot el què ens han ensenyat, per estar sempre disposats a ajudar-nos.

A l'Anna Massó per les seves recomanacions, per la seva ajuda i per la seva confiança.

Al Francesc i a l'Elena per ser tan bons companys, per tots els moments que hem compartit.

A tota la família del laboratori, a la Dra. Florensa, la Dra. Pérez-Vila, la Dra. Arenillas i la Dra. Ferrer, perquè sense elles, comprendre l'hematologia hauria estat impossible, i per la seva proximitat i la seva capacitat de ser riguroses i càlides alhora, per fer que sempre em senti com a casa.

A tot l'equip tècnic i d'infermeria, de planta, de consultes externes, de laboratori, per tota la seva ajuda, per facilitar-nos la feina en tot moment amb tan bona predisposició i alegria.

A tots els residents, en especial als d'hematologia, per ser com els meus germans de l'hospital. Gràcies a l'Anna Angona per tota la seva ajuda.

A totes aquelles persones que han format part del meu entorn laboral posterior a l'hospital del Mar, on he tingut la sort d'estar sempre envoltada de gent propera i amable, amb molts coneixements i moltes ganes de compartir-los. Gràcies als companys de Generalab i de l'Hospital de Can Ruti.

A la meva amiga i companya de residència, Irene Dot, per tots els grans moments compartits a l'hospital i a fora, i per tots els que ens queden per compartir.

A la meva cosina Anna per ser a més d'una gran amiga, qui s'ha ocupat de donar coherència gràfica a la tesi.

En general, a tots els grans amics que tinc la sort de tenir, els del Masnou, els de Barcelona, els de Florència, els de Madrid.

I el meu agraïment infinit als meus pares, per tot el que m'han ensenyat i per estar sempre al meu costat, per l'amor que sempre m'han transmès i en general per ser com són, unes persones increïbles, els millors pares que em podrien haver tocat.

Finalment, donar les gràcies a en Lluís (i els meus estimats sogres) per ser la demostració de que el que es somia pot existir, per estar sempre al meu costat, per recolzar-me i per estimar-me tan bé, i per la nostra Maria i el futur pèsol que esperem que són el millor regal que ens ha fet la vida.

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetil salicílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AUC	Area under the curve
BMO	Biopsia de médula ósea
BCSH	British Committee for Standards in Haematology
CBL	Casitas B cell lymphoma
CALR	Calreticulina
ECLAP	European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera
EIQ	Enzimoinmunoensayo quimioluminiscente
ELN	European LeukemiaNet
EPO	Eritropoyetina
G-6-PD	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GISP	Gruppo Italiano Studio Policitemia Vera
JAK	Janus Activated Kinase
Hb	Hemoglobina
Hto	Hematocrito
IL	Interleucina
IWG-MRT	The International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment
LA	Leucemia aguda
LDH	Lactato deshidrogenasa
LMC	Leucemia mieloide crónica
MF	Mielofibrosis
MFP	Mielofibrosis primaria
MFPP	Mielofibrosis post-policitemia
NGS	Next generation sequencing
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
OMS	Organización mundial de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction
PV	Policitemia Vera
PVSG	Polycythemia Vera Study Group
RIA	Radioinmunoensayo
ROC	Receiving operating characteristic
SMD	Síndrome mielodisplásico
SMPC	Síndromes mieloproliferativos crónicos
SOCS	Suppressor of cytokine signaling proteins
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TE	Trombocitemia esencial

1

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El término síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC), empleado por primera vez por William Dameshek en 1951 (Dameshek, 1951), incluye un conjunto de entidades que se caracterizan por la expansión clonal de una célula hematopoyética pluripotente común a las tres series hemopoyéticas (Adamson et al, 1976) que dan como resultado una hiper celularidad medular y un exceso de producción de células maduras. Dicho concepto fue utilizado por Dameshek para englobar la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE), la mielofibrosis primaria (MFP) y la leucemia mieloide crónica (LMC). Tras el descubrimiento en 1960 del cromosoma Filadelfia en la LMC (Nowell & Hungerford, 1960), las otras tres entidades se englobaron en la denominación de SMPC cromosoma Filadelfia negativo. En 2005 la descripción de la mutación V617F del gen *JAK2* en el 95% de los pacientes con PV y en el 60% de los casos de TE y MFP permitió apoyar la agrupación de estas tres entidades en una posición nosológica común (Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005).

En la actualidad, dado que se puede demostrar el origen clonal de la enfermedad en la gran mayoría de los casos se ha sustituido el término de síndrome mieloproliferativo crónico por el de neoplasias mieloproliferativas (NMP). La clasificación de las neoplasias hematológicas publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008 incluyó en esta categoría las NMP clásicas (PV, TE, LMC y MFP), la leucemia neutrofílica crónica, la leucemia eosinofílica crónica, la mastocitosis y las NMP no clasificables (Thiele et al, 2008).

1.2 HISTORIA Y ETIOPATOGENIA DE LA PV

La PV fue descrita por primera vez en 1892 por Louis Henri Vaquez un médico francés que detalló el caso de un hombre de 40 años que presentaba rubefacción, vértigo, disnea, palpitaciones, hepatoesplenomegalia y una marcada eritrocitosis. Basándose en el estudio post-mortem especuló que el aumento de eritrocitos podría ser consecuencia de una hiperactividad hematopoyética (Vaquez, 1895). Este conjunto de síntomas descrito por Vaquez fue denominado “Enfermedad de Vaquez”.

En 1903 William Osler describió una serie de 4 nuevos casos e incluyó en una revisión otros cinco casos anteriormente descritos en la literatura. Osler distinguió además la PV de la policitemia relativa y de la secundaria asociada a enfermedades pulmonares y cardiacas (Osler, 1903)

En 1951 William Dameshek englobó la PV, la TE, la LMC y la MFP en un grupo común de enfermedades y propuso 2 hipótesis que podían explicar su etiología: una estimulación excesiva de la médula ósea por uno o varios factores desconocidos y la ausencia o disminución de los factores inhibidores en la proliferación celular (Dameshek, 1951).

En 1974 Jaroslav Prchal y Arthur Axelrad demostraron que, al contrario de lo que sucedía en sujetos sanos, en los pacientes con PV se podían obtener cultivos de colonias eritroides sin necesidad de añadir eritropoyetina (EPO) en el medio de cultivo (Prchal & Axelrad, 1974). La existencia de un crecimiento autónomo de colonias eritroides en pacientes con PV descartaba la teoría que se proponía anteriormente de que la PV fuera consecuencia de un exceso de un factor de crecimiento endógeno y sugería un comportamiento neoplásico de la enfermedad y por lo tanto un origen clonal de la misma.

Los primeros estudios de clonalidad que confirmaron esta nueva hipótesis se llevaron a cabo por Adamson y Fialkow en 1976, a través del estudio de las isoenzimas de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G-6-PD). Sus resultados fueron consistentes con la teoría de que una alteración en una única célula madre pluripotente da lugar a una clona con propiedades proliferativas (Adamson et al, 1976). Posteriormente, otros autores confirmaron el origen clonal de la PV empleando técnicas como el Southern Blot y la PCR (Gilliland et al, 1991, Levine et al, 2006).

Sin embargo, la localización de los posibles genes implicados en la etiopatogenia de la PV era totalmente desconocida hasta el año 2002, cuando Kralovics et al describieron que el 33% de los pacientes presentaban una pérdida de heterocigosidad del brazo corto del cromosoma 9 (Kralovics et al, 2002). Este hallazgo sugería que ahí podría localizarse el gen causante de la PV.

El mayor avance en la base molecular de la PV se consiguió en 2005 cuando 5 grupos describieron de forma independiente que el 95% de los pacientes con PV presentaban la mutación V617F en el gen *JAK2*, localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005).

JAK2 forma parte de una familia de 4 proteínas tirosino cinasa citoplasmáticas (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *TYK2*) que se asocian a los receptores de factores de crecimiento de tipo I/II. Al unirse el factor de crecimiento a su receptor, el complejo receptor-*JAK* se activa y propaga la señal a través de la membrana celular para activar vías mensajeras intracelulares, fundamentalmente de la familias *STAT*. *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *TYK2* se asocian con diferentes receptores de factores de crecimiento implicados en la proliferación de los

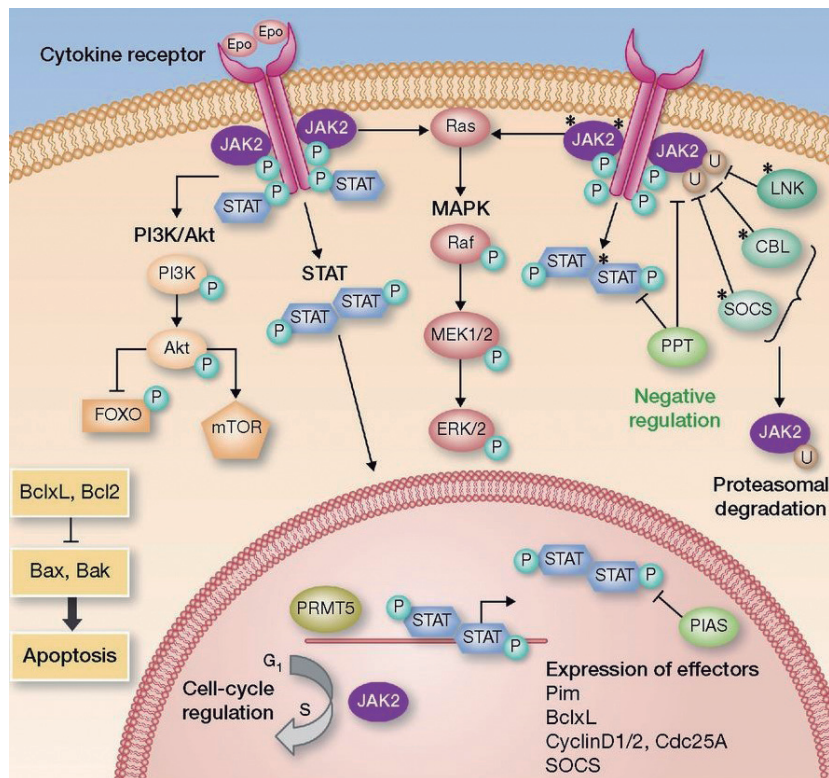
progenitores hematopoyéticos como son el receptor de la eritropoyetina, del G-CSF, de la trombopoyetina o de la IL-3 entre otros. (Parganas et al, 1998).

JAK2 también interviene en la señalización de los receptores de la prolactina, de la hormona de crecimiento y de la leptina y está implicado en la señalización a través de IFN gamma y en miembros de la familia de receptores de citosinas de la IL-10 y la IL-12 (Meyer & Levine, 2014). JAK2 es una proteína clave en el control de la hematopoyesis, como demostró el hecho de que si se bloqueaba su función en ratones *knock-out* éstos presentaban una ausencia total de progenitores hematopoyéticos (Neubauer et al, 1998).

Estructuralmente, JAK2 tiene 4 dominios: JH1, el dominio cinasa en el extremo carboxi-terminal, JH2, el dominio pseudocinasa también en el extremo carboxiterminal que es un regulador negativo de la actividad cinasa de JH1; FERM, dominio por el que se une de forma covalente al receptor transmembrana y SH2, lugar donde se produce la fosforilación de STAT.

Al unirse el ligando al receptor transmembrana, las proteínas JAK se dimerizan y activan produciéndose una autofosforilación de JAK que a su vez fosforila el propio receptor transmembrana. Como consecuencia, se crean lugares de unión para el dominio SH2 que contiene proteínas como las STAT las cuales son directamente reclutadas y fosforiladas. A continuación, las proteínas STAT (STAT3 y STAT5 en el caso de JAK2) se dimerizan y se translocan al núcleo para iniciar la transcripción de genes efectores involucrados en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la degradación de proteasomas. JAK2 también activa las vías de señalización de la PI3K/Akt y de la proteína cinasa MAPK (mitogen-activated protein kinase) favoreciendo la supervivencia celular. Por el contrario, la expresión de las SOCS (proteínas de señalización supresoras de citosinas) forma un bucle de retroalimentación negativa. SOCS 1 y SOCS 3 compiten con las proteínas STAT por la unión al receptor de citosinas, promoviendo la degradación de JAK2 a través del proteosoma mediante ubiquitinización, e interfieren con su función catalítica a través de la región de inhibición de la cinasa. JAK2 es también regulado negativamente por las proteínas “casitas B-cell lymphoma” (CBL), que actúan como ubiquitina ligasas para numerosas tirosino cinasas, y por la proteína adaptadora LNK que secuestra JAK2. También las proteínas tirosino fosfatasa (PTP) intervienen en el control de la señalización de JAK2, evitando la unión de las STAT con el ADN diana. Más allá de la activación de las cascadas de señalización citoplasmáticas, recientemente se ha descrito que JAK2 puede translocarse al núcleo produciendo un impacto directo en el estado de la cromatina (Meyer & Levine, 2014).

Figura 1: Esquema de la activación de la vía JAK-STAT (Meyer & Levine, 2014)



La mutación *JAK2V617F* hallada en la mayoría de pacientes con PV, es el resultado del cambio de una guanina por una timina en el nucleótido 1849 del ADNc, en el exón 14 del gen e implica el cambio de una valina por una fenilalanina en la posición 617 (*JAK2V617F*). Este cambio afecta a un aminoácido situado en el dominio JH2 (con actividad pseudocinasa e inhibidor del dominio cinasa JH1). Como consecuencia de la mutación V617F no se produce la inhibición del dominio cinasa JH1, lo que produce una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando. Se trata por tanto de una mutación que provoca una ganancia de función, es decir una activación permanente de esta vía de transducción de señales (Vainchenker et al, 2011).

En el año 2007, se describió que aquellos casos de PV en los que la mutación de *JAK2V617F* no se detectaba podían presentar mutaciones en el exón 12 de *JAK2*. Estas mutaciones no se localizan en un nucleótido concreto, como es el caso de la mutación V617F, sino que pueden afectar a diferentes nucleótidos. Las mutaciones en el exón 12 no se han descrito en casos de TE o de MFP V617F-negativas y parecen estar asociadas a un fenotipo más eritroide con valores más altos de Hb en el momento del diagnóstico que los casos de PV V617F-positiva, así como mayor frecuencia de valores de leucocitos y plaquetas normales (Scott et al, 2007; Pardani et al, 2007, Martínez-Avilés et al, 2007). Sin embargo, a pesar

de las diferencias en el fenotipo, la evolución clínica de los pacientes con la mutación de *JAK2* en el exón 12 parece ser muy similar a la de los pacientes con la mutación *JAK2V617F* (Passamonti et al, 2011)

El descubrimiento de las mutaciones de *JAK2* (V617F y exón 12) ha tenido un gran impacto en el diagnóstico de la PV, ya que permite demostrar el origen clonal de la enfermedad en la mayoría de los casos, facilitando por tanto su distinción de las eritrocitosis secundarias o reactivas. Sin embargo, el hecho de que la mutación *JAK2V617F* también se encuentre en una proporción importante de pacientes con TE y MFP limita su uso en el diagnóstico diferencial con estas entidades, por lo que se requiere una integración de diversos datos clínicos y biológicos para poder establecer un diagnóstico nosológico correcto.

Los mecanismos por los cuales una sola mutación puede dar lugar a tres fenotipos de neoplasias mieloproliferativas es una incógnita. Diferentes datos clínicos, biológicos y patológicos han permitido realizar varias hipótesis que, aunque se pueden explicar por separado, no son mutuamente excluyentes:

La primera hipótesis defiende la correlación entre el fenotipo y la proporción de alelos de la mutación de *JAK2*, introduciendo el concepto de carga alélica que es el cociente (*ratio*) entre *JAK2* mutado y *JAK2* total (mutado más “*wild type*”) en las células hematopoyéticas. Diferentes líneas de experimentos con ratones transgénicos que expresan niveles variables de *JAK2* dan soporte a esta hipótesis, observando que cargas alélicas de *JAK2V617F* bajas inducen un fenotipo de TE, con predominio de la trombocitosis, en cambio, cargas alélicas altas conducen a un fenotipo de PV (Tiedt et al, 2008). Los mismos resultados se observan en estudios que analizan la carga alélica en sangre periférica en pacientes con PV o TE y que concluyen que es más frecuente encontrar cargas alélicas altas en pacientes con PV que en pacientes con TE (Dupont et al, 2007; Lippert et al, 2006). Otros trabajos realizados con pacientes con PV observan que una carga alélica alta de *JAK2V617F* se relaciona con niveles de Hb y de leucocitos más altos pero recuentos de plaquetas más bajos (Vannucchi et al 2007b; Passamonti et al, 2010). A favor de esta hipótesis también se han publicado estudios realizados con colonias eritroides en los que se observa que en pacientes con PV se encuentra un gran número de colonias eritroides (BFU-E) homocigotas y aunque también pueden estar presentes en pacientes con TE en éstos se encuentran en niveles muy inferiores (Godfrey et al, 2012)

La segunda hipótesis defiende la existencia de una fase pre*JAK2* en la cual mutaciones somáticas adicionales o alelos heredados que predisponen a la enfermedad establecen una hematopoyesis clonal antes de la adquisición de *JAK2V617F*. Es decir, mutaciones

diferentes a *JAK2V617F* pueden determinar el fenotipo de la enfermedad directamente o por cooperación con las mutaciones de *JAK2*. Además, el orden en el que se adquieren las mutaciones también podría estar relacionado con el fenotipo. En este sentido, Ortmann et al han publicado un estudio que ejemplifica esta hipótesis, al demostrar que aquellos pacientes con mutación simultánea en *JAK2* y *TET2* que adquieren la mutación de *JAK2V617F* antes que *TET2* tienen mayor probabilidad de presentar un fenotipo de PV que de TE (Ortmann et al, 2015).

La tercera hipótesis hace referencia a la relación del fenotipo con la activación o inhibición de STAT1. Chen et al demostraron que el aumento de la actividad STAT1 en progenitores CD34-positivos normales produce un fenotipo tipo TE, mientras que la regulación negativa de la actividad STAT1 en progenitores *JAK2V617F*-heterocigotos produce un fenotipo similar a la PV (Chen et al, 2010).

Finalmente, existe una cuarta hipótesis que sostiene que los factores genéticos del huésped pueden contribuir a la diversidad fenotípica de las NMP. Campbell et al observaron que los pacientes con TE *JAK2V617F* positiva presentaban muchas características parecidas a la PV y este hecho les llevó a pensar en la posibilidad de que la PV y la TE con mutación de *JAK2V617F* forman un continuo biológico en el cual el grado de eritrocitosis es determinado por modificadores fisiológicos y genéticos (Campbell et al, 2005). Esta hipótesis de un modelo continuo entre TE *JAK2* positiva y PV también es defendida por Rumi et al que consideran que el factor más importante que condiciona el fenotipo es la carga alélica. En su estudio, además, encuentran que una proporción importante de pacientes con TE con mutación de *JAK2* evolucionan a PV, hecho que no se observa en las TE con mutación de calreticulina (*CALR*) (Rumi et al, 2014).

Otro aspecto importante es que los pacientes con PV pueden presentar previamente al diagnóstico una fase trombocitémica (Rumi et al, 2014). En este contexto es interesante introducir el concepto de PV enmascarada ("Masked"- PV) bajo el cual se incluyen aquellas PV que no alcanzan los niveles de Hb o de Hto requeridos por los criterios diagnósticos de la OMS 2008. En estos casos, para establecer el diagnóstico de PV sería necesario realizar pruebas adicionales como la medición de la masa eritrocitaria o la biopsia de médula ósea (Barbui et al, 2014 a y b, Álvarez-Larrán et al 2016a).

1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA PV.

La incidencia anual de PV en Europa y Estados Unidos es de aproximadamente 2 casos nuevos por cada 100000 habitantes y año (Johansson P, 2006). La incidencia de PV descrita en una serie de pacientes con neoplasias mieloides en la provincia de Girona fue de 1.33 por 100000 habitantes/año (Osca-Gelis et al, 2013). Se han descrito variaciones de la incidencia en algunas regiones así como en determinadas etnias, como es el caso de los Judíos Askenazi que presentan una incidencia mayor (Modan et al, 1971).

La mediana de edad en el momento del diagnóstico descrita en diversos estudios epidemiológicos realizados en grandes series de pacientes es de entre 61 y 62 años (Grupo Italiano Studio Policitemia –GISP–, 1995; Finnazzi et al, 2005; Tefferi et al, 2013). Algunos de estos estudios describen un discreto predominio masculino (Marchioli et al, 2005; GISP, 1995) así como una tendencia en el género masculino a presentar una edad inferior al diagnóstico (Grupo Italiano Studio Policitemia, 1995; Tefferi et al, 2013).

La frecuencia de PV según la edad en el momento del diagnóstico fue descrita por el grupo italiano en una serie de 1213 pacientes, aproximadamente un 7% de los cuales eran menores de 40 años, un 40% tenían edades entre 40 y 59 años, un 33% tenían entre 60 y 70 años y un 20% eran mayores de 70 años (GISP, 1995). La PV en niños y adolescentes es extremadamente rara (Giona et al, 2012). En estudios descriptivos realizados en la década de los 90 la incidencia anual de PV en menores de 20 años se estimaba en 2 casos nuevos cada 10 millones de personas (McNally et al, 1997). A pesar de los casos descritos, la mutación *JAK2V617F* rara vez se encuentra en los niños con eritrocitosis, por lo que es muy importante la exclusión de los trastornos secundarios para no efectuar un diagnóstico erróneo de PV (Hoffman, 2015).

La PV no se considera una enfermedad hereditaria aunque se han descrito familias con predisposición genética a presentar esta enfermedad (Kralovics et al, 2003). Recientemente, se han realizado estudios que investigan la asociación entre la mutación de *JAK2V617F* y los diferentes haplotipos descritos para el gen *JAK2V617F*. Se ha observado que la presencia de un haplotipo constitucional del gen *JAK2V617F* denominado 46/1 predispone al desarrollo de neoplasias mieloproliferativas asociadas a *JAK2V617F* (Kilpivaara et al, 2009; Jones et al, 2009; Olcaydu et al, 2009). En la mayoría de casos de PV no hay un agente causal identificable que justifique la aparición de la enfermedad, aunque en casos puntuales se ha sugerido una relación con radiaciones ionizantes, así como con la exposición a determinados tóxicos (Ratnoff & Gress, 1980; Caldwell et al, 1984)

Manifestaciones clínicas

Un 15-20 % de pacientes con PV se diagnostican de forma casual a raíz de un análisis de rutina (Tefferi et al, 2013). La mayoría de las manifestaciones clínicas de la PV son una consecuencia directa de la proliferación excesiva de las diversas líneas celulares hematopoyéticas que participan en el proceso neoplásico. Son frecuentes los síntomas inespecíficos, como astenia, cefalea, pérdida de peso, sudoración y prurito. El prurito generalizado es una de las principales manifestaciones clínicas, los pacientes lo perciben como una picazón, hormigueo o ardor generalizado que suele ocurrir después del contacto con el agua (prurito hidrogénico) (Kligman et al, 1986). Las molestias epigástricas y la gota son también síntomas frecuentes. Muchos pacientes presentan síntomas relacionados con trastornos de la microcirculación como eritromelalgia, cefalea, inestabilidad cefálica, alteraciones visuales y auditivas, isquemia digital, fenómenos parecidos al síndrome de Raynaud y tromboflebitis superficial. La eritromelalgia se caracteriza por la aparición de episodios de dolor urente, eritema y congestión en los dedos que se alivia con el frío y que sin tratamiento puede conducir a cianosis de las partes acras e incluso gangrena (Michiels et al, 1985).

Los principales hallazgos que se pueden observar en la exploración física de un paciente con PV incluyen cianosis rojiza de piel y mucosas, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensión arterial, aspecto pletórico e inyección conjuntival. En la **tabla 1** se detallan los signos y síntomas más frecuentes descritos en la PV, recopilados de diversas series de pacientes por Bilgrami S. y Greenberg R.

Tabla 1: Signos y síntomas de la PV (Bilgrami & Greenberg, 1995)

SÍNTOMAS (%)	SIGNOS (%)
Cefaleas (41-48%)	Plétora (65-84%)
Astenia (35-47%)	Inyección conjuntival (28-59%)
Molestias epigástricas (23-50%)	Esplenomegalia (50-81%)
Mareo (25-43%)	Hepatomegalia (31-50%)
Alteraciones visuales (19-31%)	Hipertensión (23-50%)
Disnea (23-34%)	Úlceras cutáneas (2%)
Prurito (14-43%)	
Sudoración (33%)	
Adelgazamiento (16-29%)	
Parestesias (29%)	
Ángor (16-23%)	
Gota (4-26%)	
Epistaxis (17%)	

Los pacientes con PV se caracterizan por presentar un alto riesgo de complicaciones tromboticas y hemorrágicas como manifestación previa al diagnóstico o en el momento de éste, o como complicación durante el curso evolutivo de la enfermedad. La patogénesis de la trombosis en las NMP es compleja, y depende tanto de factores clínicos independientes de la enfermedad (como la edad, los factores de riesgo cardiovascular y las alteraciones primarias de la coagulación) como de otros factores relacionados con las alteraciones causadas por la NMP (Cervantes et al, 2009; Barbui et al, 2013). La edad avanzada y la historia previa de trombosis han demostrado ser los principales factores de riesgo para presentar futuros eventos tromboticos en estos pacientes (Marchioli et al, 2005). Por otro lado, la leucocitosis superior a $15 \times 10^9/L$ también se ha descrito como factor de riesgo independiente de trombosis arterial en pacientes con NMP (Landolfi et al, 2007; Barbui et al, 2009), sin embargo, no se ha demostrado una asociación significativa entre el número de plaquetas en la PV y la aparición de trombosis (Di Nisio et al, 2007). Los leucocitos y las plaquetas de los pacientes con PV y con TE tienen un fenotipo activado y actualmente se cree que este hecho juega un importante papel en la patogénesis de la trombosis en estas enfermedades (Cervantes et al, 2009; Barbui et al, 2013). La presencia de la mutación *JAK2V617F* así como la carga alélica de esta mutación en relación al riesgo trombotico se ha evaluado en varios estudios. Se ha demostrado que una carga mutacional alta de *JAK2V617F* está asociada a un incremento del riesgo de eventos vasculares en PV (Vannucchi et al, 2007a; Carobbio et al, 2009; Álvarez-Larrán et al, 2014a).

Por lo que respecta al riesgo de hemorragia en los pacientes con PV, el grupo ECLAP (European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera) describió que la edad, la duración de la enfermedad y la historia previa de sangrado se asociaban al riesgo de sangrado total durante el seguimiento de la PV. Sin embargo solo la historia de sangrado previo se correlacionaba con un riesgo superior a presentar una hemorragia grave (Marchioli et al, 2005).

En la **tabla 2** se detalla la frecuencia de trombosis y hemorragias previas al diagnóstico descritas en diversos estudios realizados en amplios grupos de pacientes.

Tabla 2: Frecuencia de trombosis y hemorragia previas o en el momento del diagnóstico de PV

	Pacientes (n)	Trombosis (% pacientes)	Arteriales (% pacientes)	Venosas (% pacientes)	Hemorragia (% pacientes)
GISP, 1995	1213	33	67	33	ND
Marchioli et al, 2005	1638	38.6	75	25	8.1*
Tefferi et al, 2013	1545	23	68	32	4.2**

ND: no disponible; *Hemorragias menores y mayores; **Hemorragia mayor

En el estudio realizado por el GISP se describe que el 14% de los pacientes presentaron trombosis antes del diagnóstico y un 20% de trombosis se presentaron como primera manifestación de la enfermedad. Este grupo observó que del total de trombosis previas al diagnóstico la mayoría (46%) ocurrían durante los dos años previos al mismo (GISP, 1995). Como puede observarse en la **tabla 2** las trombosis son más frecuentes que las hemorragias en la PV y a su vez, las trombosis arteriales son más frecuentes que las venosas, representando aproximadamente 2/3 y 1/3 del total de trombosis, respectivamente. El tipo de trombosis arteriales más frecuentes en las series de pacientes del GISP y del ECLAP fueron el infarto agudo de miocardio, el infarto cerebral y el accidente isquémico transitorio (GISP, 1995; Marchioli et al, 2005). El tipo de trombosis venosas más frecuentes fueron las trombosis venosas profundas y las tromboflebitis superficiales seguidas en menor frecuencia de las embolias pulmonares (Marchioli et al, 2005). En la **tabla 3** se indican las frecuencias de trombosis según el grupo ECLAP.

Tabla 3: Frecuencias de los tipos de trombosis previas y al diagnóstico descritas por el grupo ECLAP en una serie de 1638 pacientes con PV (Marchioli et al, 2005).

Trombosis arteriales	N (%)
Infarto agudo de miocardio	146 (8.9)
Infarto cerebral	145 (8.9)
Accidente isquémico transitorio	169 (10.3)
Periférica	90 (5.5)
Trombosis venosas	N (%)
Trombosis venosa profunda	134 (8.2)
Embolismo pulmonar	39 (2.4)
Tromboflebitis superficial	100 (6.1)

La frecuencia de sangrado fue descrita también por el grupo ECLAP. En esta serie de 1638 pacientes tratados con ácido acetil salicílico (AAS), un 8.1% presentaban historia previa de sangrado (**tabla 2**), de los cuales un 4.1% fueron gastrointestinales, un 0.7% intracraneales y un 3.3% correspondían a hemorragias menores.

Las complicaciones trombo-hemorrágicas son también muy frecuentes durante el seguimiento y constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad. En la **tabla 4** se describen las frecuencias de estas complicaciones en las tres series más amplias de pacientes con PV.

Tabla 4: Frecuencia de trombosis y hemorragias durante el seguimiento de la PV

	Pacientes (n)	Trombosis mayores (% pacientes)	Arteriales (% pacientes con trombosis)	Venosas (% pacientes con trombosis)	Hemorragias (% pacientes)
GISP, 1995	1213	19	62.5	37.5	ND
Marchioli et al, 2005	1638	12	52	48	ND
Tefferi et al, 2013	1545	21	57	43	4.2*
Álvarez-Larrán et al 2016b**	890	8	59	41	5.3

ND: no disponible; *Hemorragia mayor; **Bajo tratamiento con hidroxiurea

En la **tabla 4** se constata una mayor frecuencia de trombosis arteriales sobre las venosas durante el seguimiento clínico de los pacientes. Respecto a las trombosis arteriales, la cardiopatía isquémica, la enfermedad vascular cerebral y la trombosis arterial periférica fueron las más frecuentes. En relación de las venosas, los tipos más frecuentes fueron la trombosis venosa profunda, el tromboembolismo pulmonar y la tromboflebitis superficial (GISP, 1995; Marchioli et al, 2005).

En el estudio realizado por el grupo ECLAP, la incidencia total de episodios de sangrado y de episodios de sangrado mayor (definidos como episodios de sangrado que precisaron transfusión de 2 o más concentrados de hematíes) fueron de 2.9 y 0.8 episodios cada 100 pacientes/año, respectivamente. Las hemorragias mayores más frecuentes fueron las gastrointestinales y las hemorragias menores descritas con mayor frecuencia fueron los hematomas, las epistaxis y los sangrados gingivales (Marchioli et al, 2005).

Es importante tener en cuenta que en los pacientes con PV es frecuente el desarrollo de trombosis en territorios anatómicos atípicos, siendo la trombosis del eje espleno-portal una complicación típicamente asociada a las NMP y particularmente a la PV. De hecho, la PV es la principal causa de síndrome de Budd-Chiari, complicación muy grave que se produce por oclusión trombótica de las venas suprahepáticas y que causa dolor abdominal, ictericia, hepato-esplenomegalia y el desarrollo de complicaciones secundarias a la hipertensión portal (Menon et al, 2004; Denninger et al, 2000; Kiladjian, 2008). En un metanálisis realizado por Smalberg et al que incluía 1062 pacientes con síndrome de Budd-Chiari y 855 pacientes con trombosis de la vena portal, se describe una prevalencia de NMP de 41% en aquellos pacientes con Síndrome de Budd-Chiari y de 31% en aquellos con trombosis de la vena portal, siendo la PV la etiología más prevalente en el grupo con Síndrome de Budd-Chiari (Smalberg et al, 2012).

1.4 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, DE HEMATIMETRÍA Y OTROS DATOS DE LABORATORIO.

1.4.1 Masa eritrocitaria, hemoglobina y hematocrito

La PV se caracteriza por la presencia de una eritrocitosis absoluta ocasionada por la expansión clonal de una célula hematopoyética pluripotente. La eritrocitosis absoluta se define como un aumento de la masa eritrocitaria superior al 25% de su valor medio normal. El valor teórico de normalidad para un individuo concreto se calcula mediante una fórmula (ver **figura 2**) que tiene en cuenta la superficie corporal del paciente. El 98% de los varones y el 99% de las mujeres tienen una masa eritrocitaria comprendida entre +/- 25% el valor medio. La medición de la masa eritrocitaria teniendo en cuenta la superficie corporal es más exacta que cuando se calcula en función del peso. Para la medición se utilizan glóbulos rojos marcados con Cr51 y se obtienen el valor de la masa eritrocitaria, el volumen plasmático y el volumen sanguíneo siguiendo las recomendaciones de International Committee for Standardization in Haematology (Pearson et al, 1995).

Figura 2: Cálculo de la masa eritrocitaria (García Curiel y Gómez Perales, 2001):

1. Pesar y tallar al enfermo.

2. Extraer 10 ml de sangre con una jeringa heparinizada. Apartar 1 ml en un tubo de contaje con una pequeña cantidad de saponina y mezclar para hemolizar. Esta muestra se utilizará para medir la radiación de fondo en la sangre del paciente.

3. Poner el resto de la sangre en un tubo Falcon con 1.5 ml de ACD-A. Lentamente y con agitación suave añadir 20-30 μ Ci de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}$.

4. Incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente agitándola suavemente.

5. Adicionar 50 mg de ácido ascórbico (en disolución estéril) para reducir el cromo no enlazado al estado trivalente.

6. Adicionar 30-40 ml de salino fisiológico, agitar suavemente mediante sucesivas inversiones del tubo y centrifugar a 175 g (aproximadamente 1.000 r.p.m. para una centrifuga con 15 cm de radio de giro) durante 5-10 min.

7. Retirar el plasma sobrenadante con el cromo libre.

8. Preparación del estándar: tomar aproximadamente 1 ml de la suspensión de hematíes (previamente homogeneizada) en una jeringa y pesarla. Vaciar el contenido de la jeringa en un matraz aforado y llenarlo con NH_4OH (0.4 g/l) para hemolizar. Si el matraz es de 200 ml, por ejemplo, el volumen de dilución será 200. Volver a pesar la jeringa una vez vacía.

9. El resto de la sangre se recoge en una jeringa, se pesa y se inyecta sin hacer ningún lavado. Pesar la jeringa vacía.
10. Transcurridos 30 minutos de la inyección extraer en el brazo contrario al de la inyección unos 10 ml de sangre para el contaje de su concentración radiactiva. Deberá obtenerse una muestra de sangre a los 60 minutos si se sospecha una homogeneización insuficiente (pacientes con esplenomegalia).
11. Lisar la muestra en el tubo de contaje con saponina.
12. Hacer el contaje (cpm/ml) del fondo, el estándar y la muestra. Es conveniente utilizar duplicados de cada uno de ellos.
13. Cálculo de los resultados:
El volumen sanguíneo vendrá dado por:
- $$VS = S R V_s / B$$
- donde $S = \text{cpm/ml del estándar diluido}$
 $R = P_{iny} / P_{st}$
 $P_{iny} = \text{peso (g) de la suspensión inyectada}$
 $P_{st} = \text{peso (g) de la suspensión del estándar}$
 $B = \text{cpm/ml en sangre tras 30 minutos}$
 $V_s = \text{volumen de dilución del estándar (ml)}$
- El VE y el VP se calculan a partir del VS y del Hv de la siguiente forma:
- $$Hc = f Hv$$
- $$VE = VS Hc$$
- $$VP = VS - VE$$
- donde $Hv = \text{hematocrito venoso}$
 $Hc = \text{hematocrito corporal}$
 Valor medio de $f = 0.91$

En general, una masa eritrocitaria aumentada suele correlacionarse con valores elevados de Hto y de Hb. Sin embargo, en ocasiones pueden existir valores altos de Hb o Hto en ausencia de aumento absoluto de la masa eritrocitaria. Dicha situación se denomina pseudoeritrocitosis, falsa policitemia o policitemia espúrea. Por otro lado, puede ocurrir que un aumento de la masa eritrocitaria se acompañe de valores de Hb y/o Hto normales. Esta situación es especialmente frecuente en la PV, en la que la ferropenia concomitante o bien la expansión del volumen plasmático pueden dar lugar a cifras de Hb o Hto no excesivas dando lugar a un cuadro de PV inaparente o enmascarada (Lamy et al, 1997; Álvarez-Larrán et al 2016a). En estos casos, la determinación de la masa eritrocitaria es indispensable para llegar al diagnóstico de PV.

Es importante destacar que en muchos países se ha dejado de realizar la medición de la masa eritrocitaria alegando motivos de coste y pérdida de tiempo para los pacientes. Por ello existe un gran debate en la determinación de puntos de corte de Hb o Hto que puedan considerarse marcadores sustitutos de una masa eritrocitaria elevada. En este sentido,

Pearson demostró que los valores de Hto >0.60 L/L y >0.56 L/L en hombres y mujeres, respectivamente, se correspondían con un aumento de la masa eritrocitaria en todos los pacientes. Por tanto, en pacientes con sospecha de PV y Hto superior a estos valores no es necesario determinar la masa eritrocitaria (Pearson, 1991).

Del mismo modo, los criterios diagnósticos de la OMS tanto del 2001 como del 2008 proponen un punto de corte de Hb definitorio de PV que se ha establecido en un valor >18.5 g/dL en hombres y >16.5 g/dL en mujeres (Thiele et al, 2008), sin embargo este valor no ha sido verificado (McMullin et al, 2005). Dicho punto de corte ha sido motivo de importantes críticas ya que una importante proporción de pacientes con PV presentan valores de Hb por debajo de estas cifras (Spivak, 2002), por lo que la adopción generalizada de los criterios de la OMS unido al abandono de la medición de la masa celular podría dar lugar a que muchos pacientes no se diagnosticasen correctamente (Johanson et al, 2005; Álvarez-Larrán et al, 2012a).

En la tabla que se muestra a continuación (**tabla 5**) pueden observarse la media y/o mediana de los valores de Hb y de Hto al diagnóstico de diferentes series de pacientes con PV.

Tabla 5: Valores de Hb y Hto medios en varias series de pacientes

	Núm. pacientes	Hb (g/dl)	Hto (%)
Passamonti et al, 2000	163	19.0 +/-2 **	57 +/-6 **
Marchioli et al, 2005 (ECLAP)	1638	ND	47** (SD 0.06)
Gangat et al, 2007	459	18.5* (12.2-26.4)	ND
Tefferi et al, 2013	1545	18.4* (15.1-26.5)	55* (36-78)
Ancochea et al, 2014	99	17.7* (11.7-23.8)	54* (37-73)

ND: no disponible; * Mediana (rango); ** Media +/- desviación estándar

1.4.2 Leucocitos, plaquetas

La leucocitosis y la trombocitosis se observan con frecuencia en la PV. Dicho hallazgo se explica por el hecho de que los progenitores portadores de la mutación *JAK2V617F* dan lugar a un incremento de la diferenciación tanto de la serie roja como de la serie granulocítica y megacariocítica. En la **tabla 6** se indican los valores de leucocitos y plaquetas al diagnóstico en diferentes series de pacientes, así como el porcentaje de pacientes que presentaban leucocitosis o trombocitosis al diagnóstico.

Tabla 6: Medias/medianas de los recuentos de leucocitos y plaquetas al diagnóstico de diferentes series de pacientes con PV.

	Núm. Pacientes	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	Leucocitos elevados (% pacientes)	Plaquetas elevadas (% pacientes)
Tefferi et al, 2013	1545	10.4*	466*	49% ($>10.5 \times 10^9/L$)	53% ($>450 \times 10^9/L$)
Marchioli et al, 2005 (ECLAP)	1638	10.9**	398**	38% ($>10 \times 10^9/L$) 15.1% ($>15 \times 10^9/L$)	ND
Gangat et al, 2007	459	12.4*	483*	34% ($>15 \times 10^9/L$)	ND
Álvarez-Larrán et al, 2016b	890	10.8*	506*	58% ($>10 \times 10^9/L$)	57% ($>450 \times 10^9/L$)
Passamonti et al, 2000	163	11**	357**	32% ($>12 \times 10^9/L$)	32% ($>400 \times 10^9/L$)

ND: no disponible; *Mediana; **Media

Antes del descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* como marcador clonal de la PV, la presencia de leucocitosis y la trombocitosis en un paciente con eritrocitosis solía considerarse un dato de mieloproliferación y por tanto favorecía el diagnóstico de PV. Es por ello que la leucocitosis y trombocitosis estuvieron incluidos en los criterios diagnósticos de la PV hasta el año 2005 como criterios menores (Berlin, 1975; Pearson y Messinezy, 1996; Pierre et al, 2001).

Hay que tener en cuenta que los pacientes fumadores tienen recuentos de neutrófilos superiores que los no fumadores, por lo que según algunos autores el valor de neutrófilos empleado como criterio de PV debería ser $>12.5 \times 10^9/L$ en los fumadores y de $10 \times 10^9/L$ en los no fumadores (Pearson & Messinezy, 1996).

1.4.3 Pruebas bioquímicas

Saturación de oxígeno

Cualquier proceso en el que haya una reducción del oxígeno en sangre y por lo tanto una hipoxia, da lugar a la estimulación de la producción de EPO que ocasionará una eritrocitosis. Es por lo tanto necesaria la medición de la saturación de oxígeno para diagnosticar una eritrocitosis secundaria. Por ello, en muchos de los criterios diagnósticos empleados en el pasado se requería descartar la existencia de hipoxemia crónica definida como el valor de la saturación de oxígeno inferior al 92% para poder establecer el diagnóstico de PV (Berlin, 1975; Pearson y Messinezy, 1996; Pierre et al, 2001).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que hay situaciones causantes de hipoxia que no podrían ser descartadas con la medición de la saturación de oxígeno únicamente; éste es el caso de la intoxicación por monóxido de carbono, de la presencia de hemoglobinas de alta afinidad por el oxígeno y del síndrome de apnea obstructiva del sueño (McMullin et al, 2005). Asimismo, siempre debe tenerse en cuenta la posibilidad de la existencia de una etiología mixta de la eritrocitosis: paciente con hipoxemia crónica y PV.

Vitamina B12 sérica y capacidad de transporte libre de vitamina B12

El incremento del nivel de vitamina B12 y de la capacidad de transporte libre de ésta es característico de la PV. Esto es debido a la liberación de transcobalamina secundaria al aumento de la masa granulocítica (McMullin et al, 2005). Sin embargo, aunque estas determinaciones se habían usado como criterio diagnóstico en la etapa de los criterios diagnósticos formulados por el PVSG (Berlin, 1975), actualmente, a causa del descubrimiento de los marcadores clonales, carecen de utilidad (McMullin et al, 2005).

Ferritina

Es más frecuente encontrar valores bajos de ferritina en la PV que en las eritrocitosis secundarias (Pearson et al, 2000, McMullin et al, 2005). De hecho, hasta el 95% de pacientes con PV presentan ferropenia por hiperconsumo o por sangrado (Woessner et al, 2006). Es importante tener este aspecto en cuenta dado que el paciente podría presentar valores de Hb o de Hto normales o por debajo de los criterios definitorios de PV.

1.4.4 Eritropoyetina

La EPO es una hormona glicoproteica que controla la producción de eritrocitos y es el principal agente estimulador de la eritropoyesis natural, por lo que la medición de los niveles de EPO sérica puede proporcionar información sobre la causa subyacente de la eritrocitosis. Aproximadamente, el 90% de la EPO en el ser humano se produce en el riñón y la parte restante se forma principalmente en el hígado.

Un incremento de la EPO puede deberse a un problema renal (estenosis de la arteria renal, quistes renales), hipoxemia crónica, así como también a causa de tumores que producen EPO o fármacos que estimulen su producción, como los andrógenos, produciéndose en todos estos casos una eritrocitosis mediada por EPO. También puede producirse una eritrocitosis por la administración de EPO exógena como en el caso de los atletas que la consumen para mejorar su rendimiento (McMullin, 2008).

Por el contrario, los niveles de EPO sérica en la mayoría de los pacientes con PV son característicamente bajos (85%) incluso después de la realización de una flebotomía (Messinezy et al, 2002). La utilidad de la EPO sérica para diferenciar la PV de una eritrocitosis no clonal ha sido demostrada en múltiples estudios (Birgegard & Wide, 1992; Mossuz et al, 2004). Sin embargo, la EPO sérica ha perdido relevancia para establecer el diagnóstico de PV si en el paciente ya hemos demostrado la mutación de *JAK2V617F*, por lo que muchos autores han considerado su determinación hoy en día redundante (Spivak & Silver, 2008).

1.4.5 Cultivos de colonias eritroides

El cultivo de la fracción mononuclear no adherente de células de sangre periférica o células de médula ósea de pacientes con PV en un medio que contiene suero sin la adición de EPO, conduce al crecimiento de colonias eritroides. El crecimiento de colonias en ausencia de EPO se conoce como crecimiento endógeno. Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1974 por Jaroslav Prchal y Arthur Axelrad (Prchal JF & Axelrad AA, 1974) y demostró ser un buen marcador de PV dado que no se observa en pacientes sanos ni con eritrocitosis secundarias en los que el crecimiento de BFU-E (unidad formadora de colonias eritroides) es dependiente de la presencia de EPO (Lemoine et al, 1986; Partanen et al, 1989; Florensa et al, 1989). Es importante destacar que este fenómeno también se ha descrito en otras NMP como en la TE (Anderson et al, 1982; Pennatur-Das et al, 1984; Eridani et al, 1984; Juvonen et al, 1993). El descubrimiento de la mutación de *JAK2V617F* en 2005, el elevado coste y la complejidad técnica han hecho que en la actualidad su uso quede restringido a fines investigacionales.

1.4.6 Citogenética

Un 14% de los pacientes con PV presentan alteraciones citogenéticas al diagnóstico (Diez-Martin et al, 1991). No existe una alteración específica de esta entidad pero su presencia es indicativa de alteración clonal neoplásica del órgano hematopoyético. Las alteraciones citogenéticas más frecuentes encontradas en individuos con PV son las trisomías en los cromosomas 8 y 9, la delección (20q) y alteraciones en el cromosoma 1 (Gangat et al, 2008). Cuando la PV se transforma a MF la frecuencia de pacientes con alteraciones citogenéticas es mayor. La evolución a mielodisplasia o a leucemia aguda (LA) también se ha asociado con alteraciones cromosómicas inespecíficas (Andrieux & Demory, 2005). Además, la citogenética constituye en algún estudio un factor pronóstico de supervivencia. Tefferi *et al* en su serie de 1545 pacientes con PV demostraron en el análisis multivariante que la presencia de un cariotipo anormal es un factor pronóstico adverso independiente de supervivencia global (Tefferi et al, 2013).

1.4.7 Biología molecular

El descubrimiento de la mutación de *JAK2V617F* ha supuesto un avance muy importante en el diagnóstico de las NMP. Está presente en un 96% de las PV, pero no es específica de esta enfermedad, ya que también puede demostrarse en un 60% de los pacientes con TE y MFP (Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005) y, en menor proporción, en otras entidades de origen mieloide (Steensma, 2006; Vainchenker et al, 2011). La mutación *V617F* puede detectarse en sangre total, granulocitos, plaquetas, médula ósea o progenitores hematopoyéticos obtenidos por cultivos celulares *in vitro* (Bellosillo et al, 2007). Existen diferentes técnicas para estudiar la presencia de la mutación como la secuenciación Sanger convencional, la pirosecuenciación o técnicas de PCR aleloespecífica. De entre las diferentes técnicas que permiten evaluar la presencia de la mutación *JAK2V617F*, la que tiene una mayor sensibilidad es la PCR-aleloespecífica en tiempo real (Steensma, 2006).

Además de la mutación *JAK2V617F*, se han descrito diversas mutaciones localizadas en el exón 12 de *JAK2* que están presentes en el 2-3% de PV negativas para la mutación *JAK2V617F* (Scott et al, 2007). Las mutaciones en el exón 12 no se han descrito en casos de TE o de MFP. El estudio de las mutaciones en el exón 12 se lleva a cabo por secuenciación directa o técnicas de *high resolution melting*.

Otras mutaciones descritas en NMP son las que ocurren en los genes *MPL* y *CALR*. Estas mutaciones se detectan en un porcentaje variable de pacientes con TE y MFP, pero solo

excepcionalmente se han descrito en la PV (Pardanani et al, 2006; Nangalia et al, 2013; Klampfl et al, 2013).

Recientemente, se han descrito mutaciones en genes diferentes a *JAK2* en un porcentaje variable de pacientes con PV. Estos genes pueden clasificarse, según su función, en genes implicados en la señalización intracelular (*LNK, CBL*), genes implicados en la regulación epigenética (*TET2, ASXL1, IDH1/IDH2, IKZF1, EZH2, DNMT3A*) y genes implicados en el procesamiento del ARN mensajero o splicing (*SF3B1, SRSF2, U2AF1*) (Tefferi, 2010; Brecqueville et al, 2012). La detección de estas alteraciones se realiza mayoritariamente mediante técnicas de NGS (Next generation sequencing), su papel diagnóstico y potencial valor pronóstico está todavía por determinar y no está indicada su detección en el diagnóstico de rutina. Lundberg et al, realizaron un estudio en el que analizaron 104 genes para detectar la presencia de mutaciones somáticas en una cohorte de 197 pacientes con NMP usando la técnica de NGS y observaron que de los 94 pacientes con PV analizados, 7 (7%) no presentaban mutaciones somáticas, 52 (55%) presentaban una mutación, 23 (24%) presentaban dos mutaciones, 9 (10%) presentaban 3 mutaciones y 3 (3%) presentaban 4 mutaciones (Lundberg et al, 2014).

1.4.8 Sangre periférica, aspirado y biopsia de médula ósea

En la sangre periférica de un paciente con PV se observa, a excepción de la microcitosis, una morfología eritrocitaria normal, la presencia de eritroblastos es rara y en todo caso porcentualmente poco importante. El aumento de hematíes se acompaña en muchos casos de leucocitosis con desviación a la izquierda y ocasional presencia de algunos granulocitos inmaduros en ausencia de blastos. Los estigmas morfológicos disgranulopoyéticos suelen ser discretos. Con frecuencia aparece basofilia y/o eosinofilia en grado moderado. También puede observarse un aumento de las plaquetas que muestran discretos rasgos distrombopoyéticos y gigantismo (indicativo de juventud plaquetaria). La función plaquetaria suele estar alterada y se pueden observar ocasionalmente fragmentos de megacariocitos circulantes (Woessner et al, 2006).

El aspirado de médula ósea se caracteriza por una hiperplasia de las series medulares, sobretudo de la serie megacariocítica. Se observan megacariocitos gigantes que coexisten con micromegacariocitos. La población eritroblástica de morfología aparentemente normal domina porcentualmente la población granulopoyética (al contrario de lo que ocurre en la LMC) y se pueden observar abundantes nidos eritroblásticos. Dado que el 95% de pacientes presentan ferropenia en la tinción de Perls se evidencia una gran disminución o

ausencia de sideroblastos, así como la disminución o desaparición de la hemosiderina de los macrófagos medulares (Woessner et al, 2006).

La biopsia de médula ósea (BMO) acostumbra a ser hipercelular, con marcada reducción de la grasa y proliferación trilínea (panmielosis), aunque también puede presentar únicamente proliferación unilínea de serie roja o bilínea de serie roja y megacariocítica. La eritropoyesis es normoblástica y la granulopoyesis morfológicamente normal. La megacariopoyesis suele estar aumentada, con elementos de aspecto pleomórfico y núcleos hiperlobulados que suelen agruparse de forma laxa y en ocasiones en localización paratraqueal. La reticulina es normal o discretamente aumentada y los depósitos de hierro están ausentes en más del 95% de los casos (Ellis et al, 1986).

Aunque algunos estudios y la propia clasificación OMS afirman que la histología medular puede ser útil para distinguir la PV de la TE, los análisis detallados a partir de estudios prospectivos aleatorizados no apoyan la inclusión de la histología como herramienta diagnóstica eficaz. En el estudio PVSG01 en el que se aleatorizaron 432 pacientes con PV a tres grupos de tratamiento, se estudiaron las BMO de 281 pacientes antes del inicio del tratamiento y cada dos años a partir del mismo. Dicho estudio mostró que la BMO no era una herramienta adecuada para diferenciar PV de TE dado que en fases tempranas estas enfermedades compartían muchas características morfológicas. Así, aunque la hipercelularidad medular y la hiperplasia e hipertrofia megacariocítica fueron hallazgos casi constantes en las BMO, una revisión paralela en la que se estudiaron biopsias de médula ósea de pacientes con TE no tratada demostró que un 90% de los casos presentaban celularidad >50% e hiperplasia megacariocítica (Iland et al, 1983). Además, en 7 de los 281 pacientes con PV, la celularidad y número de megacariocitos eran prácticamente normales. Por último, se observó fibrosis reticulínica en un 11% de las biopsias pre-tratamiento, pero se demostró que este hecho no era indicativo de desarrollar una mielofibrosis post-PV (Ellis et al, 1975; Ellis & Peterson 1979; Ellis et al, 1986). Varios autores han cuestionado la reproductibilidad y utilidad de la BMO especialmente en la distinción entre la fase prefibrótica de la MFP y la TE (Wilkins et al, 2008; Brousseau et al, 2010; Buhr et al, 2012). Wilkins et al realizaron un estudio en el que 3 patólogos analizaron las BMO de 370 pacientes diagnosticados prospectivamente de TE con los criterios del PVSG; los patólogos evaluaban 16 características celulares y realizaban un diagnóstico según los criterios de la OMS. Los autores describen una significativa variabilidad inter-observador especialmente cuando se realizaba el diagnóstico histológico y en la evaluación de las características individuales como la morfología de los megacariocitos (Wilkins et al, 2008).

La BMO no se ha incluido dentro de los criterios diagnósticos de PV hasta el año 2001 cuando se formularon los criterios de la OMS (Pierre et al, 2001). Los criterios utilizados anteriormente (PVSG) para el diagnóstico de la PV eran exclusivamente clínicos y de laboratorio y no incluían los datos de la BMO porque se consideraba que no existían suficientes estudios morfológicos realizados de forma independiente y/o de criterios estandarizados que apoyasen su inclusión (Pearson & Messinezy, 1996). Sin embargo, en 2001 se incluyeron los datos morfológicos de la medula ósea en los criterios B, y posteriormente en la revisión de los criterios de la OMS 2008 se mantuvieron como criterio menor de PV (Thiele et al, 2008). Este grupo de expertos consideró que la PV presenta datos histopatológicos característicos de la enfermedad, si bien admiten la necesidad de correlacionar los hallazgos histológicos con los datos clínicos y de laboratorio para poder establecer un diagnóstico definitivo (Pierre et al, 2001). La inclusión de la BMO en los criterios OMS se basó en varios estudios realizados al respecto (Michiels & Juvonen, 1997; Thiele et al, 1999, Bartl et al, 1993; Thiele et al, 2006).

Por lo tanto, a pesar de que muchos autores han cuestionado su reproducibilidad y utilidad, las características histológicas de la BMO están ganando cada vez más protagonismo, por lo que en la nueva clasificación de la OMS 2016 se ha propuesto que la BMO pase a ser un criterio mayor (Arber et al, 2016). Este hecho implicaría la realización sistemática de BMO a todos los pacientes con sospecha de PV a excepción de aquellos con eritrocitosis absoluta: Hb >18.5 g/dL en hombre (Hcto 55.5%) o Hb >16.5 g/dL en mujeres (Hcto 49.5%), mutación en JAK2 y disminución de la eritropoyetina sérica. Sin embargo, no hay estudios que evalúen la exactitud diagnóstica de la BMO en la PV, por lo que se desconoce si practicar una BMO añade algún valor a realizar el diagnóstico únicamente con datos clínicos y de laboratorio.

1.5 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

1.5.1 Polycythemia Vera Study Group (PVSG)

En la década de los setenta el grupo de estudio de la Policitemia Vera (“Polycythemia Vera Study Group”) formuló unos criterios con la finalidad de poder estandarizar el diagnóstico en los pacientes candidatos a ensayos clínicos. Estos criterios se convirtieron en los criterios de referencia para el diagnóstico de PV durante las décadas siguientes (ver **tabla 7**).

Tabla 7: Criterios diagnósticos de la PV según el PVSG (Berlín, 1975)

Criterios mayores	Criterios menores
A1 Masa eritrocitaria ^a Varones ≥ 36 ml/kg mujeres ≥ 32 ml/kg	B1 Plaquetas $> 400 \times 10^9/L$
A2 Saturación arterial $O_2 \geq 92\%$	B2 Leucocitos $> 12 \times 10^9/L$
A3 Esplenomegalia	B3 Índice de FAG $> 100^b$
	B4 Vitamina B_{12} sérica > 900 pg/mL o CT $B_{12} > 2200$ pg/mL ^c
Diagnóstico de PV si: A1+ A2+ A3 A1+ A2+ 2 criterios de la categoría B	

^a Medida por ⁵¹Cr; ^b en ausencia de fiebre o infección; ^c capacidad de transporte libre de vitamina B12

En 1996 Pearson y Messinezy reformularon los criterios diagnósticos del PVSG, introduciendo los nuevos descubrimientos científicos descritos en ese periodo que eran útiles en el diagnóstico de la PV como la citogenética como marcador de clonalidad, el crecimiento endógeno de colonias eritroides y el valor de EPO sérica (Pearson & Messinezy, 1996). Los cambios introducidos en la nueva propuesta incluyeron:

- La definición de eritrocitosis absoluta (criterio A1) como una masa eritrocitaria por encima del 25% de su valor medio normal teórico basándose en la fórmula de predicción del International Committee for Standardization in Haematology (Pearson et al, 1995). Previamente se había observado que la expresión de la masa eritrocitaria en mL/Kg usada tradicionalmente carecía de precisión en personas obesas dado que el tejido graso, que está menos vascularizado, ocasionaba valores más bajos de masa eritrocitaria en los pacientes con sobrepeso que en individuos delgados.
- La sustitución de la saturación de oxígeno (criterio A2) por un criterio más amplio en el que se especificaba la exclusión de otras enfermedades asociadas a eritrocitosis.

- La adición de un nuevo criterio A (A4) que incluía la demostración de la presencia de un marcador de clonalidad, como por ejemplo un cariotipo medular anormal.
- La leucocitosis (criterio B2) debía ser neutrofílica y se valoraron dos puntos de corte en función de si se trataba de un paciente fumador que debía ser $>12 \times 10^9/L$ o no fumador en los que el punto de corte era $>10 \times 10^9/L$
- La eliminación del índice FAG y la vitamina B12 presente en los antiguos criterios B3 y B4, respectivamente.
- La inclusión de esplenomegalia ecográfica como nuevo criterio B3
- La demostración del crecimiento endógeno de colonias eritroides o la presencia de unos niveles de EPO inferiores a la normalidad como nuevo criterio B4.

El diagnóstico de PV se realizaba si cumplía los dos primeros criterios mayores (aumento de la masa eritrocitaria y ausencia de causas de eritrocitosis secundarias) más otro criterio A o dos criterios B (**tabla 8**).

Tabla 8: Criterios diagnósticos modificados de la PV (Pearson & Messinezy, 1996)

A1 Masa eritrocitaria aumentada ($> 25\%$ del valor normal calculado) o Hto ≥ 0.60 L/L en hombres o ≥ 0.56 L/L en mujeres.

A2 Ausencia de causa de eritrocitosis secundaria

A3 Esplenomegalia palpable (sin evidencia de otra causa secundaria como hipertensión portal)

A4 Marcador de clonalidad (p.ej cariotipo medular anormal)

B1 Trombocitosis ($> 400 \times 10^9/L$)

B2 Leucocitosis neutrofílica (neutrófilos $>10 \times 10^9/L$; en fumadores $> 12.5 \times 10^9/L$)

B3 Esplenomegalia demostrada por ecografía o gammagrafía

B4 Crecimiento endógeno de BFU-E o disminución de la eritropoyetina sérica

Diagnóstico de PV si:

A1+ A2+ A3 o A4

A1+ A2+ 2 criterios de la categoría B

1.5.2 Criterios OMS: 2001, 2008, 2016

En el año 2001, la OMS publicó su clasificación de las neoplasias de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, basada en un consenso internacional realizado por patólogos, clínicos e investigadores incluyendo unos criterios para el diagnóstico de la PV (Pierre et al, 2001). Esta clasificación fue actualizada en 2008 (Thiele et al, 2008) y recientemente en 2016 (Arber et al, 2016).

En 2001, la OMS proponía como criterios diagnósticos de PV un conjunto de 5 criterios A y cuatro criterios B. Las novedades con respecto a los criterios del PVSG se describen a continuación:

- Por primera vez, se propone un valor de Hb (superior a 18.5 g/dL en hombres y a 16.5 g/dL en mujeres) como marcador indirecto del aumento de la masa eritrocitaria.
- Se especifican todas aquellas causas de eritrocitosis secundarias (Criterio A) que debían ser descartadas: eritrocitosis familiar, eritrocitosis inducida por hipoxia, hemoglobinas de alta afinidad por el oxígeno, truncamiento del receptor de EPO y producción inapropiada de EPO de causa neoplásica.
- El crecimiento endógeno de colonias eritroides pasó a considerarse un criterio A.
- Se incluyó por primera vez la histología medular como un criterio B.

Para realizar el diagnóstico de PV según la OMS 2001 era necesario cumplir los dos primeros criterios A (demostrar la eritrocitosis absoluta con la masa eritrocitaria o con los valores de Hb y descartar otras causas de eritrocitosis secundarias) más otro criterio A o dos criterios B (ver **tabla 9**).

Tabla 9: Criterios diagnósticos de la PV según la OMS 2001 (Pierre et al, 2001)

A1 Masa eritrocitaria > 25% del valor normal calculado, o Hb > 18.5 g/dL (hombres), > 16.5 g/dL (mujeres), o > 99% del valor de referencia según la edad, sexo y altitud de residencia.

A2 Ausencia de causa de eritrocitosis secundaria, incluyendo:

- Ausencia de eritrocitosis familiar
- Ausencia de aumento de eritropoyetina debido a:
 - hipoxia (pO_2 arterial $\leq 92\%$)
 - hemoglobinas de alta afinidad por el oxígeno
 - truncamiento del receptor de la eritropoyetina
 - producción inapropiada de eritropoyetina, de causa neoplásica

A3 Esplenomegalia

A4 Anomalía genética clonal diferente al cromosoma Ph o al gen de fusión BCR/ABL, en células de la médula ósea.

A5 Crecimiento endógeno in vitro de colonias eritroides

B1 Trombocitosis ($> 400 \times 10^9/L$)

B2 Leucocitosis ($> 12 \times 10^9/L$)

B3 Biopsia medular que demuestre panmielosis, con proliferación prominente eritroide y megacariocítica.

B4 Eritropoyetina sérica disminuida

Diagnóstico de PV si:

A1 + A2 y otro criterio A

A1 + A2 + 2 criterios B

El descubrimiento de la mutación de *JAK2V617F* supuso un punto de inflexión en el diagnóstico de las NMP y en especial en la PV (Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005). La detección de las mutaciones de *JAK2* (V617F o exon 12), ha permitido simplificar enormemente el diagnóstico de la PV dado que su presencia demuestra el origen clonal de la enfermedad permitiendo diferenciarla fácilmente de las eritrocitosis secundarias sin la necesidad de realizar técnicas complejas como el cultivo de progenitores hemopoyéticos.

La incorporación del estado mutacional de *JAK2* a los criterios diagnósticos de PV propuestos por la OMS 2008 (ver **tabla 10**) permitió reducirlos a dos criterios mayores y tres criterios menores.

- El primer criterio mayor consolidó la definición de la PV a partir de los valores de Hb superiores a 18.5 g/dL en hombres y a 16.5 g/dL en mujeres relegando la medición de la masa eritrocitaria a letra pequeña en la que con una llamada sobre el valor de Hb se hacía referencia a “otra evidencia de aumento del número de glóbulos rojos”.
- En el segundo criterio mayor se incorporó la demostración de la presencia de una mutación de *JAK2* (*JAK2V617F* o del exón 12 de *JAK2*).
- La BMO pasó a ser el primer criterio menor, mientras que el valor de EPO sérica inferior a la normalidad y el crecimiento endógeno de colonias eritroides permanecían como criterios menores.

El diagnóstico de PV según estos criterios se realiza con la presencia de los dos criterios mayores y un criterio menor o, en ausencia de la mutación de *JAK2*, con el primer criterio mayor y dos criterios menores (Thiele et al, 2008). La consecuencia práctica de la aplicación de estos criterios es que se podía realizar el diagnóstico de PV con una sola analítica en la que se demostrasen los niveles de Hb elevados, la mutación de *JAK2* y la EPO baja. Sólo en los pacientes en los que no se demostraban estas tres características era necesario realizar pruebas adicionales como la masa eritrocitaria (si el valor de Hb no llegaba a los criterios definidos) o la BMO (si los niveles de EPO eran normales, las mutaciones de *JAK2* eran negativas, pero se observaba crecimiento endógeno de colonias eritroides).

Tabla 10: Criterios diagnósticos según la OMS 2008 (Thiele et al, 2008)

Criterios mayores	Criterios menores
1. Hb > 18,5 g/dL en hombres, > 16,5 g/dL en mujeres u otra evidencia de aumento del número de glóbulos rojos ^a 2. Presencia de <i>JAK2V617F</i> u otra mutación funcionalmente similar como mutación del exón 12 de <i>JAK2</i>	1. BMO hipercelular (según edad) con crecimiento trilínea (panmielosis) con proliferación prominente de las series eritroide, granulocítica y megacariocítica 2. Valor de EPO sérica inferior a los valores de normalidad 3. Crecimiento endógeno de colonias eritroides in vitro
El diagnóstico requiere la presencia de ambos criterios mayores y un criterio menor o del primer criterio mayor con dos criterios menores.	

^a Hb o Hto mayor del percentil 99% referido al rango de edad, sexo y altitud del centro de referencia o Hb mayor de 17 g/dL para hombres y 15 g/dL para mujeres si se asocia a un incremento sostenido y documentado de más de 2 g/dL con respecto al valor basal del enfermo en ausencia de tratamiento concomitante con Hierro, o elevación de la masa eritrocitaria mayor del 25% del límite superior de la normalidad medida por métodos isotópicos.

Recientemente se ha publicado la propuesta de los nuevos criterios diagnósticos de PV según la OMS (Arber et al, 2016), a la espera de la actualización de la nueva edición del libro con la clasificación de los tumores de los órganos hematopoyéticos. Los principales cambios con respecto a los anteriores criterios son:

- La reducción del valor de Hb definitorio de PV a Hb >16.5 g/dL en hombres y >16.0 g/dL en mujeres. Además, se incorpora también el Hto a la definición de PV. En este caso bastaría tener un Hto >49% en hombres y >48% en mujeres para poder establecer el diagnóstico si se cumple el resto de los otros criterios.
- La inclusión de la histología medular como criterio mayor.
- La reducción de los criterios menores a la presencia de unos niveles de EPO inferiores a los valores de normalidad.
- La desaparición del criterio del crecimiento endógeno de colonias eritroides.

Según estos nuevos criterios el diagnóstico de PV se establece cuando se cumplen los tres criterios mayores o, en ausencia de una mutación de *JAK2*, cuando presenta los dos primeros criterios mayores y el criterio menor. Sin embargo, se hace una especificación en la que se indica que se puede realizar el diagnóstico en ausencia de la BMO si el paciente presenta una Hb superior a 18.5 g/dL en hombres y a 16.5 g/dL en mujeres, la presencia de

la mutación de *JAK2* y un valor de EPO sérica inferior a los valores de normalidad, pero que de no realizarse la biopsia no podría valorarse si existe una fibrosis inicial de la médula ósea que podría ser de utilidad pronóstica (Arber et al, 2016).

Tabla 11: Criterios diagnósticos según la OMS 2016 (Arber et al, 2016)

Criterios mayores	Criterios menores
<p>A1 Hb > 16.5 g/dL en hombres, > 16.0 g/dL en mujeres o Hto >49% en hombres, >48% en mujeres o aumento de la masa eritrocitaria.*</p> <p>A2 BMO hipercelular (según edad) con crecimiento trilínea (panmielosis) con proliferación prominente de las series eritroide, granulocítica y megacariocítica</p> <p>A3 Presencia de la mutación <i>JAK2V617F</i> o de la mutación del exón 12 de <i>JAK2</i>.</p>	<p>B Valor de eritropoyetina sérica inferior a los valores de normalidad.</p>
<p>A1 + A2 + A3 ó A1 + A2 + B</p>	

* > 25% del límite superior de la normalidad medida por métodos isotópicos.

** El segundo criterio mayor (la BMO) puede no ser necesaria en aquellos casos con una eritrocitosis absoluta que presente niveles de Hb >18.5 g/dL en Hombres (o Hto 55.5%) o >16.5 g/dL en mujeres (o Hto 49.5%) si el tercer criterio mayor y el criterio menor están presentes. Sin embargo, la fibrosis inicial (presente en un 20% de pacientes) sólo puede detectarse realizando la BMO; este hallazgo puede predecir una más rápida progresión a una mielofibrosis post-PV.

1.5.3 Criterios según British Committee for Standards in Haematology (BSCH)

En el año 2005 el grupo inglés (British Committee for Standards in Haematology) publicó unas guías para el diagnóstico, investigación y manejo de las eritrocitosis/policitemias donde se proponían unos criterios diagnósticos basados en una modificación de los criterios PVSG (McMullin et al, 2005). Sin embargo, el descubrimiento de la mutación de *JAK2V617F* ese mismo año y posteriormente las mutaciones en el exón 12 de *JAK2* obligó a una rápida revisión de los mismos (McMullin et al, 2007). Se formularon unos criterios para aquellos pacientes que presentaban una mutación de *JAK2* y otros para aquellos pacientes que fueran negativos para estas mutaciones (ver **tabla 12**).

Tabla 12: Criterios diagnósticos de la PV según el BCSH (McMullin et al, 2007)

PV <i>JAK2</i> positiva	PV <i>JAK2</i> negativa
<p>A1 Hto alto (> 0.52 L/L en hombres, > 0.48 L/L en mujeres) o masa eritrocitaria aumentada (> 25% del valor normal calculado)^a</p> <p>A2 Mutación de <i>JAK2</i></p>	<p>A1 Masa eritrocitaria aumentada (> 25%) o Hto ≥ 0.60 L/L en hombres, ≥ 0.56 L/L en mujeres)</p> <p>A2 Ausencia de mutación de <i>JAK2</i></p> <p>A3 No causas de eritrocitosis secundarias</p> <p>A4 Esplenomegalia palpable</p> <p>A5 Presencia de una alteración genética adquirida (excluida BCR/ABL) en las células hematopoyéticas.</p> <p>B1 Trombocitosis (recuento de plaquetas > 450x10⁹/L)</p> <p>B2 Leucocitosis neutrofílica (recuento de neutrófilos > 10x10⁹/L en no fumadores; > 12.5x10⁹/L en fumadores)</p> <p>B3 Evidencia radiológica de esplenomegalia</p> <p>B4 Crecimiento endógeno de colonias eritroides o valores de eritropoyetina en suero bajos</p>
<p>El diagnóstico requiere cumplir ambos criterios.</p>	<p>El diagnóstico requiere A1+A2+A3 + otro criterio A o 2 criterios B.</p>

^a La patología dual (coexistencia de una eritrocitosis secundaria o de una eritrocitosis relativa) rara vez puede estar presente en pacientes con una enfermedad mieloproliferativa con la mutación de *JAK2*. En esta situación, sería prudente reducir el Hto con el mismo objetivo que para la PV.

Los criterios BCSH (British Committee for Standards in Haematology) destacan por su enorme simplicidad y practicidad ya que en los pacientes con mutación de *JAK2*, lo cual supone más del 95% de los pacientes, permiten establecer el diagnóstico de PV basándose simplemente en el Hto (Hto superior a 0.52 L/L en hombres y a 0.48 L/L en mujeres para diagnosticar la PV).

1.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La PV es una NMP que se distingue por una proliferación preferente de la eritropoyesis (eritrocitosis), sin embargo, en un 50% de casos también puede presentar leucocitosis y trombocitosis. Por este motivo, el diagnóstico diferencial de la PV debe plantearse con todas aquellas causas de eritrocitosis absolutas así como también con otras NMP.

La eritrocitosis absoluta se confirma cuando existe un aumento de la masa eritrocitaria superior al 25% del valor medio calculado según el índice de superficie corporal del paciente (Pearson et al, 1995). Las eritrocitosis absolutas se dividen en tres grupos: primarias, secundarias e

idiopáticas. El término eritrocitosis primaria se emplea cuando existe un defecto intrínseco al componente eritropoyético de la médula ósea. Por el contrario, las eritrocitosis secundarias son aquellas en las que la producción de glóbulos rojos esta mediada por otro proceso. Existen numerosas causas de eritrocitosis (ver **tabla 13**) por lo que es importante realizar una buena historia clínica y exploración física así como realizar una analítica inicial básica para realizar un buen diagnóstico diferencial. El prurito hidrogénico, los antecedentes de trombosis y hemorragias así como la existencia de neutrofilia, trombocitosis, microcitosis, LDH, ácido úrico elevado y ferropenia son datos que deben hacer sospechar la existencia de una PV.

Tabla 13: Clasificación de las eritrocitosis absolutas (McMullin, 2016)

ERITROCITOSIS PRIMARIAS	
Congénitas – Mutaciones del receptor de la EPO	Adquiridas – Policitemia Vera – Mutaciones de LNK (congénitas o adquiridas)
ERITROCITOSIS SECUNDARIAS	
Congénitas – Hb con alta afinidad por el oxígeno – Déficit de difosfoglicerato mutasa – Metahemoglobinemia – Incremento hereditario de ATP – Mutaciones en el gen de von Hippel-Lindau (Eritrocitosis de Chuvash) Mutaciones del gen PHD2 Mutaciones del gen HIF2 α	Adquiridas Mediadas por EPO Proceso hipóxico central : – Alteraciones cardiopulmonares por comunicación derecha-izquierda – Enfermedades respiratorias crónicas – Eritrocitosis del fumador – Intoxicación por monóxido de carbono – Síndromes de hipoventilación (incluida la apnea del sueño) – Hábitat en altitud Alteraciones renales con hipoxia: – Estenosis de la arteria renal – Riñón poliquístico – Hidronefrosis – Post trasplante renal – Etapa final de la enfermedad renal Secreción patológica de EPO: – Hemangioblastoma – Meningioma – Carcinomas / Adenomas de paratiroides – Hepatocarcinoma – Carcinoma de células renales – Feocromocitoma – Leiomiomas uterinos EPO exógena (asociada a fármacos): – Administración de EPO – Administración de andógenos
ERITROCITOSIS IDIOPÁTICA	

Hay que tener en cuenta sin embargo que la mutación de *JAK2V617F* no es específica de PV y también puede presentarse en un 60% de pacientes con TE y MFP (Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005). Este hecho es de especial importancia en el estudio del paciente con trombocitosis. En estos casos, una vez demostrada la mutación *JAK2V617F*, se plantea el diagnóstico diferencial entre la TE y la PV inaparente o enmascarada en la que los valores de Hb y de Hto no alcanzan los criterios definidos por la OMS. Hay que ser conscientes de la existencia de esta forma de presentación clínica de la PV para no hacer un falso diagnóstico de TE *JAK2V617F* positiva. Para ello, la medición de la masa eritrocitaria por métodos isotópicos juega un papel crucial en la distinción de estas dos entidades. Diversos autores han descrito que la carga alélica de *JAK2V617F* también podría ser de utilidad ya que suele ser más alta en la PV que en la TE (Scott et al, 2006; Godfrey et al, 2012; Godfrey et al, 2013; Ancochea et al, 2014).

1.7 EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

La evolución de la PV está marcada por la predisposición a las trombosis arteriales y venosas, así como por la transformación a mielofibrosis y a LA. Actualmente con el tratamiento citorreductor, el control del Hto mediante flebotomías y la profilaxis primaria antitrombótica con dosis bajas de AAS han disminuido las complicaciones trombóticas y mejorado la supervivencia. No obstante, la esperanza de vida de los pacientes con PV es inferior a la de la población general (Hultcrantz et al, 2012).

La mortalidad y sus causas también han sido evaluadas por diferentes grupos. En las tablas siguientes se observan los resultados de 3 amplias series de pacientes.

Tabla 14: Mortalidad en tres series de pacientes.

	Seguimiento	Mortalidad
IWG (Tefferi et al, 2014) 1545 pacientes	Media seguimiento 6.9 años (0 a 39)	347 (23%) 164 de causa conocida
ECLAP (Marchioli et al, 2005) 1638 pacientes	Media seguimiento 2.7 años	164 (10%) Ratio: 3.7 muertes por 100 personas/año
GISP, 1995 1213 pacientes	Media seguimiento 6.1 años (0 a 32.9)	225 (18.5%) Ratio: 2.94 muertes por 100 personas/año

El grupo italiano (GISP) es el estudio con mayor seguimiento (hasta 20 años), en él se describen las causas de mortalidad (ver **tabla 15**) siendo la causa más frecuente la de origen cardiovascular (GISP, 1995).

Tabla 15: Causas de muerte según el GISP (GISP, 1995)

Causas de muerte	No (%)
Cardiovascular	71 (37)
Trombosis arterial	46 (24)
Infarto agudo de miocardio	14 (7.3)
Muerte súbita	15 (7.8)
Ictus isquémico	17 (8.8)
Tromboembolismo venoso	11 (5.7)
Trombosis cerebral de senos	2 (1)
Hemorragia cerebral	1 (0.5)
Embolia pulmonar	6 (3.1)
Trombosis esplácnica	2 (1.0)
Otras causas cardiovasculares	14 (7.3)
Paro cardíaco	14 (7.3)
Hemorrágicas	5 (2.6)
Hemorragia gastrointestinal	5 (2.6)
Cáncer	57 (30)
Leucemia aguda mieloide	28 (14.6)
Neoplasia de mama	5 (2.6)
Cáncer colorrectal	6 (3.1)
Neoplasia pulmonar	4 (2.1)
Otras neoplasias	14 (7.3)
Complicaciones de la PV	5 (2.6)
Mielodisplasia	1 (0.5)
Fase gastada	4 (2.1)
Otras causas	54 (28.1)
Fallo respiratorio	14 (7.3)
Fallo hepático	4 (2.1)
Otras	36 (18.9)

Los eventos trombohemorrágicos son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la PV, sin embargo, cuando los pacientes son tratados de acuerdo con las recomendaciones de consenso, la supervivencia de éstos depende en buena medida del riesgo de transformación a mielofibrosis o a leucemia aguda/síndrome mielodisplásico (LA/SMD). La supervivencia disminuye drásticamente cuando se produce la transformación mielofibrótica, siendo ésta de 5.7 años (Passamonti et al, 2008). La transformación aguda tiene muy mal pronóstico, con una mediana de supervivencia inferior a 6 meses (Tam et al, 2008; Kennedy et al, 2013)

La mielofibrosis post-policitemia (MFPP) se debe sospechar ante un aumento progresivo del tamaño del bazo y la aparición de síndrome leucoeritroblástico en el frotis de sangre periférica. Para establecer el diagnóstico es necesario realizar una BMO. Los criterios diagnósticos de la MFPP se detallan en la **tabla 16**.

Tabla 16: Criterios para el diagnóstico de MFPP (Barosi et al, 2008).

CRITERIOS REQUERIDOS
A1. Diagnóstico previo de PV según la OMS.
A2. Fibrosis medular grado 2-3 (escala de 0 a 3) o grado 3-4 (escala de 0 a 4)
CRITERIOS ADICIONALES
B1. Anemia o disminución mantenida de flebotomías (en ausencia de tratamiento citorreductor) o de tratamiento citorreductor para la eritrocitosis.
B2. Síndrome leucoeritroblástico.
B3. Aumento de la esplenomegalia palpable >5 cm del valor basal o esplenomegalia palpable de nueva aparición.
B4. Aparición de más de uno de los siguientes tres síntomas constitucionales: Pérdida de peso > 10% en 6 meses, sudación nocturna, fiebre no explicada > 37.5°C.
El diagnóstico requiere los criterios A1 y A2, más dos criterios B.

La frecuencia de MFPP oscila entre el 5 y el 50% en función de la serie de pacientes estudiada (Chievitz & Thiede, 1962; Silverstein, 1974, 1976; Najean et al, 1994). La incidencia de esta complicación es difícil de estimar debido a la larga evolución de la enfermedad, las variaciones en los criterios diagnósticos utilizados a lo largo de la historia, así como por los diferentes tratamientos utilizados. En el estudio realizado por el grupo del PVSG se describió una incidencia del 9% de MFPP sin encontrar diferencias significativas de la incidencia en los pacientes tratados con tratamiento mielosupresor (clorambucilo o P32) respecto a los pacientes tratados únicamente con flebotomías (Ellis et al, 1986). Por el contrario, otros autores han cuestionado la ausencia de influencia del tratamiento en relación a la transformación a MFPP dado que es raro observar esta complicación en pacientes tratados únicamente con flebotomías (Chievitz & Thiede, 1962; Spivak, 2002). También se ha descrito un mayor riesgo de MFPP en los pacientes que cumplen los criterios de resistencia a la hidroxiurea descritos por la European LeukemiaNet (Barosi et al, 2010, Álvarez-Larrán et al, 2012b), especialmente aquellos que experimentan esplenomegalia progresiva a pesar de altas dosis de hidroxiurea o bien citopenias a la mínima dosis para mantener la respuesta (Álvarez-Larrán et al, 2016b).

Entre los diferentes factores de riesgo descritos, existe una evidencia clara de que la carga alélica de *JAK2V617F* juega un papel predominante (Randi et al, 1994; Marchioli et al, 2005; Tefferi et al, 2006; Vannucchi et al 2007a, b; Passamonti et al, 2008; Álvarez-Larrán et al, 2009; Passamonti et al, 2010; Álvarez-Larrán et al, 2014a). En este sentido, un hallazgo constante en la hemopoyesis de los pacientes con MFPP es la existencia de una expansión de los progenitores *JAK2V617F* homocigotos (Moliterno et al, 2008; Stein et al, 2011; Angona et al, 2014).

La primera asociación entre carga mutacional de *JAK2V617F* y transformación a MF fue descrita por nuestro grupo. En una serie de 116 pacientes, de los cuales 17 se habían transformado, la probabilidad de MF a 15 años fue del 55% y el 17% en pacientes homocigotos y heterocigotos para *JAK2V617F*, respectivamente (Álvarez-Larrán et al, 2009). Estos resultados fueron confirmados por Passamonti et al, en una serie de 338 pacientes en la cual la determinación de *JAK2V617F* se realizó mediante PCR cuantitativa. La transformación a MFPP se observó en 8 pacientes, todos ellos con cargas mutacionales de *JAK2V617F* > 50% (Passamonti et al, 2010). Cabe destacar que en los estudios anteriormente citados se había realizado una sola determinación de la carga mutacional de *JAK2V617F*, pudiendo ésta variar a lo largo de la enfermedad a causa del tratamiento o por la evolución clonal de la enfermedad. En un estudio posterior, la determinación seriada de la carga mutacional de *JAK2V617F* predijo mejor la transformación a MF que la determinación puntual. Así, el riesgo de transformación a mielofibrosis fue significativamente superior en aquellos pacientes que mantenían durante su evolución clínica cargas alélicas superiores al 50% (Álvarez-Larrán et al, 2014a).

La incidencia de transformación a LA/SMD también es difícil de precisar debido a los mismos inconvenientes descritos en la transformación a mielofibrosis. Se ha descrito una frecuencia de entre el 5 y el 15% de transformación a LA/SMD tras 10 años de evolución de la enfermedad (Berk et al, 1981; Haanen et al, 1981; Najean et al, 1997 a,b,c; Donovan et al 1984; Fruchtman et al 1997; Weinfeld et al, 1994; Tatarsky & Sharon, 1997; Brusamolino et al, 1984; Passamonti et al, 2000; Kiladjian et al, 2003). Cabe destacar que muchos de estos estudios, se han realizado a partir de series que incluyeron pacientes tratados con fármacos leucemogénos como pipobroman o P32. Actualmente dos estudios realizados con un gran número de pacientes muestran frecuencias algo inferiores que las descritas previamente. En la **tabla 17** se detalla la frecuencia de transformación a LA/SMD observada por el grupo ECLAP y por Tefferi *et al*, así como los factores de riesgo que se han relacionado con la transformación a LA/SMD.

Tabla 17: Transformación a LA/SMD en PV

	Pacientes (n)	Casos LA/SMD n (%)	Mediana de años desde el diagnóstico de PV a la transformación a LA/SMD	Factores de riesgo
ECLAP (Finazzi et al, 2005)	1545	50 (3%)	10.8	Edad avanzada Sexo femenino Colesterol sérico bajo Exposición a P ³² *, Pipobroman, Busulfán, Clorambucil
Tefferi et al, 2014	1638	22 (1.4%)*	8.4	Edad avanzada Cariotipo anormal Leucocitos > o = 15x10 ⁹ /l Exposición a P ³² *, clorambucil, pipobroman

*P³² Radiofósforo, **3 de los 22 casos fueron precedidos de mielofibrosis

Cabe destacar que aunque las tasas de LA descritas en estas grandes series eran relativamente bajas, en un estudio reportado por Kiladjian et al con un seguimiento muy prolongado, la tasa de LA fue bastante mayor, siendo la incidencia acumulada en los pacientes tratados con hidroxiurea en primera línea 6.6%, 16.5% y 24% a los 10, 15 y 20 años, respectivamente (Kiladjian et al, 2011).

La mediana del tiempo desde el diagnóstico inicial de PV hasta la transformación a LA varía según los estudios y oscila de los 4.6 a los 19 años (Tefferi et al, 2013; Tefferi et al, 2014; Kiladjian et al, 2003; Passamonti et al, 2004; Finazzi et al, 2005; Gangat et al, 2007; Bonicelli et al, 2013; Stein et al, 2013; Sever et al, 2013).

1.8 TRATAMIENTO

Los objetivos del tratamiento de la PV incluyen la prevención de la trombosis y de la hemorragia, el control de los síntomas asociados a la enfermedad, la disminución del riesgo de transformación a LA y mielofibrosis, y el manejo de determinadas situaciones de riesgo como la cirugía o el embarazo (Barbui et al, 2011a). Sin embargo, con los tratamientos actuales, no es posible disminuir o modificar el riesgo de transformación a mielofibrosis, que forma parte de la historia natural de la enfermedad.

El sistema convencional de clasificación de los pacientes con PV según el riesgo trombótico divide a los pacientes en dos grupos en base a dos variables clínicas: la edad avanzada (más de 60 años) y la historia de trombosis. Así, aquellos pacientes que presentan al menos una de estas dos variables se clasifica dentro del grupo de alto riesgo, mientras que el resto de pacientes se consideran de bajo riesgo. Existe un consenso internacional en adaptar el tratamiento al riesgo del paciente, de forma que los pacientes de alto riesgo son candidatos a recibir citorreducción, mientras que los de bajo riesgo se manejan de forma conservadora con flebotomías (Barbui et al, 2011a).

En general, el AAS a bajas dosis (75-100 mg/día) está indicado en todos los pacientes con PV, dado que este fármaco disminuye la frecuencia de trombosis tal como se demostró en el estudio ECLAP (Landolfi et al, 2004) y es útil también en el control de la sintomatología microvascular (Michiels et al, 2006). Existe consenso internacional en la necesidad de control de los factores de riesgo cardiovascular, así como recomendar el abandono del hábito tabáquico.

El control del Hto es fundamental para reducir el riesgo de trombosis. Así, se recomienda mantener el Hto < 45% tanto en pacientes tratados con flebotomías como con citorreducción. Dicha recomendación se basa en un estudio observacional en el que los pacientes que mantenían el Hto por debajo de este valor tenían una baja frecuencia de trombosis, mientras que la incidencia aumentaba de forma progresiva a medida que los pacientes se mantenían con un nivel de Hto más elevado (Pearson y Wetherley-Mein, 1978). Esta observación ha podido ser confirmada en un estudio aleatorizado en el que los pacientes que recibieron una mayor intensidad de tratamiento (Hto < 45%) mostraron una menor tasa de muerte cardiovascular y de trombosis mayores que los pacientes tratados con un objetivo más laxo (Hto 45-50%) (Marchioli et al, 2012).

En los pacientes de alto riesgo (edad > 60 años y/o episodio de trombosis previa) está indicado el tratamiento citorreductor. También serán candidatos al tratamiento citorreductor aquellos que presenten poca tolerancia a las flebotomías o un frecuente requerimiento de éstas, esplenomegalia progresiva o sintomática, sintomatología sistémica importante, recuentos de plaquetas > $1500 \times 10^9/L$ y leucocitosis progresiva (Barbui et al, 2011a).

La hidroxiurea es el tratamiento citorreductor más frecuentemente utilizado en primera línea, si bien en pacientes jóvenes (menores de 40-50 años) podría emplearse el interferón alfa pegilado. En la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos aleatorizados con la finalidad de establecer si el interferón pegilado podría ser una alternativa a la hidroxiurea como tratamiento citorreductor de primera línea.

En 2009 la European LeukemiaNet (ELN) definió unos criterios de respuesta clínico-hematológica que clasifican la respuesta en completa y parcial. Sin embargo, dichos criterios enumerados en la **tabla 18**, tenían limitaciones dado que no representaban una medida directa del beneficio del tratamiento para el paciente. La consecución de una respuesta hematológica completa no se ha podido relacionar con una menor frecuencia de complicaciones trombóticas o hemorrágicas (Álvarez-Larrán et al, 2012b).

Por este motivo y dada la necesidad de poder valorar el beneficio que las nuevas terapias experimentales aportaban al paciente, el grupo de trabajo formado por la ELN y el IWG-MRT, realizó una revisión de las recomendaciones de valoración de la respuesta en PV y TE (criterios de respuesta en PV revisados en **tabla 19**)

Tabla 18: Criterios de respuesta clínico-hematológica en PV definidos por ELN (Barosi et al, 2009)

Grado de respuesta	Definición
Respuesta completa (RC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hto < 45% sin flebotomías y, 2. Recuento de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$ y, 3. Recuento leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ y, 4. Tamaño del bazo normal por imagen y, 5. No sintomatología asociada a la enfermedad*
Respuesta parcial (RP)	<p>En pacientes que no cumplen los criterios de RC:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hto < 45% sin flebotomías o, 2. Respuesta en ≥ 3 de los otros criterios
No respuesta	Cualquier respuesta que no cumpla los criterios de RP

*Sintomatología asociada a la enfermedad incluye la sintomatología microvascular, el prurito y la cefalea.

Tabla 19: Criterios de respuesta en PV revisados por ELN y IWG-MRT (Barosi et al, 2013)

Respuesta completa	<ol style="list-style-type: none"> A. Resolución duradera* de los signos relacionados con la enfermedad, incluyendo hepatoesplenomegalia palpable, mejoría de los grandes síntomas †, y B. Remisión duradera* del recuento sanguíneo periférico, definida como Ht < 45% sin flebotomías; Recuento de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$, recuento de leucocitos < $10 \times 10^9/L$, y C. Sin enfermedad progresiva, y ausencia de cualquier evento hemorrágico o trombótico, y D. Remisión histológica de la médula ósea definida como la presencia de normocelularidad ajustada a la edad, desaparición de la hiperplasia trilinea y ausencia de fibrosis reticulínica superior a grado 1.
---------------------------	---

Respuesta parcial	Resolución duradera los de signos relacionados con la enfermedad, incluyendo hepatoesplenomegalia palpable, mejoría de los grandes síntomas †, y Remisión duradera* del recuento sanguíneo periférico, definida como Ht < 45% sin flebotomías; Recuento de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$, recuento de leucocitos $< 10 \times 10^9/L$, y Sin enfermedad progresiva, y ausencia de cualquier evento hemorrágico o trombótico, y Sin remisión histológica de la médula ósea definida como persistencia de la hiperplasia trilinea.
No respuesta	Cualquier respuesta que no satisfaga la remisión parcial.
Enfermedad progresiva	Transformación a MFPP, SMD o LA ‡

La respuesta molecular no es necesaria para la asignación como respuesta completa o respuesta parcial. La evaluación de la respuesta molecular requiere análisis en granulocitos de sangre periférica. La respuesta completa se define como la erradicación de una anomalía preexistente. La respuesta parcial se aplica sólo a pacientes con al menos un 20% de carga alélica basal. La respuesta parcial se define como una disminución $\geq 50\%$ de la carga alélica.

* Duración mínima de 12 semanas.

† Gran mejoría de los síntomas (disminución de ≥ 10 puntos) en TSS de MPN-SAF (Emanuel et al, 2012).

‡ Para el diagnóstico de MFPP, ver los criterios de IWG-MRT (Barosi et al, 2008); Para el diagnóstico de SMD y LA, ver criterios de la OMS.

Aproximadamente un 15% de pacientes son resistentes o intolerantes a la hidroxiurea (Álvarez-Larrán et al, 2016b). La ELN ha elaborado unos criterios de resistencia/intolerancia a este fármaco con la finalidad de ayudar a identificar a aquellos pacientes candidatos a tratamiento de segunda línea (Barosi et al, 2009). Son los siguientes:

1. Necesidad de flebotomías para mantener Hto < 45% después de 3 meses de hidroxiurea a una dosis mínima de 2 g/día, o
2. Mieloproliferación incontrolada (plaquetas $> 400 \times 10^9/L$ y leucocitos $> 10 \times 10^9/L$) después de 3 meses de hidroxiurea a una dosis mínima de 2 g/día, o
3. Imposibilidad para reducir un 50% una esplenomegalia masiva por palpación ($> 10\text{cm}$) o imposibilidad de controlar completamente la sintomatología asociada a la esplenomegalia después de 3 meses de hidroxiurea a una dosis mínima de 2 g/día, o
4. Recuento absoluto de neutrófilos $< 1.0 \times 10^9/L$ o recuento de plaquetas $< 100 \times 10^9/L$ o Hb < 10 g/dL a la mínima dosis de hidroxiurea requerida para conseguir una respuesta clínico-hematológica completa o parcial, o
5. Presencia de úlceras en las piernas u otra toxicidad extra-hematológica inaceptable a cualquier dosis de hidroxiurea (manifestaciones mucocutáneas, sintomatología gastrointestinal, neumonitis o fiebre a cualquier dosis de hidroxiurea).

El ruxolitinib ha sido aprobado por la FDA y la EMA como alternativa terapéutica de segunda línea en los pacientes con PV intolerantes o resistentes a hidroxiurea. Esta recomendación se basa en los resultados del estudio RESPONSE y RESPONSE-2, que evaluaron la eficacia y seguridad de ruxolitinib frente al mejor tratamiento disponible en pacientes con PV con resistencia o intolerancia a la hidroxiurea. En ambos estudios, ruxolitinib fue superior a la terapia estándar para el control del Hto y de los síntomas asociados a la enfermedad, mientras que en el estudio RESPONSE fue también superior al mejor tratamiento disponible para la reducción del volumen esplénico (Vannucchi et al, 2015; Passamonti et al, 2017). A pesar de la eficacia demostrada de ruxolitinib, es necesario un seguimiento a largo plazo para confirmar su utilidad en la disminución de los eventos trombóticos y la transformación a mielofibrosis.

Otras modalidades terapéuticas de segunda línea son el busulfán y el radiofósforo, ambos únicamente indicados en pacientes de edad avanzada (más de 75 años) dado que ambos fármacos aumentan el riesgo de transformación a LA (Finazzi et al, 2005). El busulfán puede lograr una mielodepresión prolongada por lo que se requiere un estrecho control hematológico para suspender el fármaco cuando se consigue la normalización de la cifra de leucocitos y plaquetas (Messinezy et al, 1995; Álvarez-Larrán et al, 2014b). La principal indicación del radiofósforo es en pacientes de edad avanzada que no puedan seguir controles con la regularidad adecuada, debido a la prolongada duración de su efecto mielodepresor (Balan & Critchley, 1997).

La anagrelida puede ser una opción adecuada, en combinación con flebotomías en el paciente joven que presenta trombocitosis como único criterio para administrar tratamiento citorreductor (Anagrelide Study Group, 1992).

En algunos pacientes el prurito puede constituir una manifestación clínica importante que requiere tratamiento específico. Se pueden emplear medidas no farmacológicas (como control de la temperatura del agua en caso de prurito hidrogénico y prevenir la sequedad de la piel), antihistamínicos (Diehn & Tefferi, 2001), o inhibidores de la recaptación de serotonina como la Paroxetina a dosis de 20 mg/día (Tefferi & Fonseca, 2002). Otros tratamientos que pueden ser útiles para el tratamiento del prurito son los inhibidores de JAK, el interferón alfa y la fototerapia ultravioleta (Pardanani et al, 2011; Muller et al, 1995; Baldo et al, 2002).

2

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los criterios diagnósticos de la PV se han ido modificando a lo largo de los años paralelamente a los nuevos descubrimientos científicos respecto a la fisiopatología de la enfermedad. A pesar de ello, algunos aspectos de los criterios para establecer el diagnóstico de esta entidad siguen siendo controvertidos, como el valor de corte de Hb o Hto idóneo para hacer el diagnóstico, la reproducibilidad de la histología medular o la necesidad de mantener unos criterios y otros no.

En este contexto, nos planteamos realizar tres trabajos de investigación con los siguientes objetivos:

- Identificar el valor de Hb o Hto a partir del cual sería necesaria la determinación de la masa eritrocitaria en pacientes con un diagnóstico de sospecha de PV o TE.
- Evaluar la exactitud diagnóstica de la EPO sérica y de la carga alélica de *JAK2V617F* como marcadores diagnósticos de PV.
- Analizar la sensibilidad y la especificidad de diferentes combinaciones de criterios diagnósticos con la finalidad de saber qué combinación es mejor para realizar el diagnóstico de PV.
- Evaluar la exactitud diagnóstica de la BMO en pacientes con PV, TE y MFP y valorar la correlación de los hallazgos histológicos con la presencia de mutaciones y con la evolución clínica.

3

RESULTADOS

3.1 TRABAJO 1

Papel de la eritropoyetina sérica y de la carga alélica en el diagnóstico de la policitemia vera.

Ancochea, A., Álvarez-Larrán, A., Morales-Indiano, C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Angona, A., Senín, A., Bellosillo, B., Besses, C.

3.1.1 RESUMEN

Uno de los criterios menores para el diagnóstico de PV según la OMS 2008 es presentar unos niveles de EPO sérica inferiores a los valores de normalidad, pero su utilidad diagnóstica se basa en estudios realizados antes del descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*. Alternativamente, el BCSH propuso unos criterios simplificados en los que la determinación de la EPO no es necesaria. A raíz del descubrimiento de la mutación de *JAK2V617F* se han realizado múltiples estudios que describen la relación de la carga alélica de esta mutación con el fenotipo de la NMP. Los pacientes con PV presentan de forma más frecuente cargas alélicas de la mutación superiores al 50% que los pacientes con TE. El objetivo del presente estudio fue evaluar la exactitud diagnóstica de la EPO sérica y de la carga alélica de *JAK2V617F* como marcadores diagnósticos de PV. Dadas las diferencias observadas en los criterios diagnósticos de la OMS 2008 y del BCSH, también se plantea como objetivo valorar qué conjunto de criterios diagnósticos era más sensible y más específico para el diagnóstico de la PV.

Se incluyeron en el estudio un total de 287 pacientes (PV n=99, TE n=137, eritrocitosis no clonal n=51). La determinación de EPO se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA) antes de mayo de 2006 y por enzimoimmunoensayo quimioluminiscente (EIQ) posteriormente a esta fecha. La carga alélica de *JAK2V617F* se determinó por PCR cuantitativa alelo-específica. Se realizaron curvas ROC (Receiving Operating Characteristic) para evaluar la precisión diagnóstica de la EPO y de la carga mutacional de *JAK2V617F* como marcadores de PV. También se calculó la sensibilidad y la especificidad de los criterios diagnósticos de la OMS 2008 (Hb > 18.5 g/dL en hombres o > 16.5 g/dL en mujeres, presencia de la mutación *JAK2V617F* y EPO baja) y del BCSH (Hto > 52% en los hombres o > 48% en las mujeres y la presencia de la mutación *JAK2V617F*).

Los niveles bajos de EPO presentaban una buena exactitud diagnóstica como marcador diagnóstico de PV, obteniendo el método EIQ una mejor AUC (Area Under the Curve) que el RIA (0.87 y 0.76 respectivamente). La cuantificación de la carga alélica de *JAK2V617F* obtuvo una precisión diagnóstica excelente con una AUC de 0.95. La sensibilidad y la especificidad de la cuantificación de *JAK2V617F* se calcularon usando el valor de corte de 35%, dado que era el valor que ofrecía una mayor especificidad asegurando una sensibilidad superior al 80%. Los criterios diagnósticos del BCSH presentaron una mayor sensibilidad que los de la OMS 2008 (79% frente a 45% para BSCH y OMS, respectivamente). Ambos criterios mostraron una alta especificidad (97% y 100% respectivamente). La adición de los niveles bajos de EPO sérica o de la carga alélica individualmente no mejoró la exactitud diagnóstica de los criterios del BCSH, pero la inclusión de ambos parámetros aumentó la

sensibilidad al 83% manteniendo una especificidad del 96%. Como conclusión, los criterios diagnósticos propuestos por el BCSH permiten un diagnóstico sencillo y fiable de la PV mientras que la adición de EPO o de la carga alélica de *JAK2V617F* no mejoran la exactitud diagnóstica.

3.1.2 COPIA DEL ARTÍCULO

Ancochea, A., Álvarez-Larrán, A., Morales-Indiano C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Angona, A., Senín, A., Bellosillo, B., Besses C. (2014) The role of serum erythropoietin level and JAK2 V617F allele burden in the diagnosis of polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 167(3), 411-7.

3.2 TRABAJO 2

Criterios histológicos OMS de las neoplasias mieloproliferativas: reproductibilidad, exactitud diagnóstica y correlación con las mutaciones genéticas y la evolución clínica.

Álvarez-Larrán, A., **Ancochea, A.**, García, M., Climent, F., García-Pallarols, F., Angona, A., Senín, A., Barranco, C., Martínez-Avilés, L., Serrano, S., Bellosillo, B., Besses, C.

3.2.1 Resumen

La BMO está incluida en los criterios diagnósticos de las NMP, como criterio menor en la OMS 2008 y como criterio mayor en la reciente publicación de la OMS 2016. Sin embargo, existe controversia respecto a su reproductibilidad. Para evaluar la exactitud diagnóstica de la histología en estas enfermedades, así como para evaluar su correlación con la presencia de determinadas mutaciones y su relación con el pronóstico clínico, dos patólogos revisaron de forma ciega las biopsias de médula ósea correspondientes a 211 pacientes diagnosticados de NMP. A pesar del escaso acuerdo en la evaluación de las características histológicas valoradas individualmente, la concordancia entre patólogos cuando se establecía el diagnóstico definitivo de la entidad fue buena (índice Kappa de 0.67). La especificidad de la histología fue del 100%, 98.5% y 98% en PV, TE y MFP, respectivamente, mientras que la sensibilidad del diagnóstico histológico fue baja en PV y TE (32.5% y 54% respectivamente) y aceptable en MFP (75%). Trece pacientes de 146 (9%) con fenotipo clínico de TE fueron diagnosticados de MFP en fase prefibrótica. La falta de acuerdo en el diagnóstico histológico o el diagnóstico de NMP inclasificable fue más frecuentemente observado en aquellos pacientes con TE *JAK2V617F* positivos que en los casos con mutación de *CALR*, mientras que las alteraciones en los megacariocitos y la fase prefibrótica de la MFP fue observada más frecuentemente en las TE con mutación de *CALR*. En conclusión, los criterios histológicos de las NMP presentan una exactitud diagnóstica limitada debido a su baja sensibilidad. Los pacientes con NMP *JAK2V617F* positivos presentan histologías más heterogéneas, mientras que los pacientes con TE y mutación de *CALR* presentan atipias en los megacariocitos y se asocian más frecuentemente a la fase prefibrótica de la MFP.

3.2.2 COPIA DEL ARTÍCULO

Álvarez-Larrán, A., Ancochea, A., García, M., Climent, F., García-Pallarols, F., Angona, A., Senín A., Barranco, C., Martínez-Avilés, L., Serrano, S., Bellosillo, B., Besses, C. (2014) WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes. *British Journal of Haematology*, 166(6), 911-9.

3.3 TRABAJO ADICIONAL

Medición de la masa eritrocitaria en pacientes con diagnóstico de sospecha clínica de policitemia vera o trombocitemia esencial.

Álvarez-Larrán A, **Ancochea A**, Angona A, Pedro C, García-Pallarols F, Martínez-Avilés L, Bellosillo B, Besses C.

3.3.1 Resumen

La demostración del aumento de la masa eritrocitaria medida por métodos isotópicos era el principal criterio para el diagnóstico de PV según los criterios elaborados por el PVSG. Con los criterios diagnósticos de la OMS (2008) la presencia de unos valores de Hb superiores a 18.5 g/dL y 16.5 g/dL en hombres y mujeres, respectivamente, se consideraban marcadores indirectos de un incremento de la masa eritrocitaria; por esta razón en muchos centros se dejó de realizar esta prueba diagnóstica. Sin embargo, existe una proporción de pacientes con PV que no alcanzan estos valores de Hb establecidos por la OMS. Por este motivo, y dado que la PV puede tener un inicio trombocitósico, este grupo de pacientes pueden ser diagnosticados erróneamente de TE si no se realiza el estudio de la masa eritrocitaria. Es importante diferenciar entre PV y TE dado que los pacientes con PV tienen una esperanza de vida menor y un mayor riesgo trombótico y de transformación a mielofibrosis que los pacientes con TE. Además, las recomendaciones de tratamiento son diferentes en estas dos entidades. Por lo tanto, la determinación de la masa eritrocitaria por métodos isotópicos puede ser un requisito imprescindible para diferenciar la PV y la TE cuando no se alcanzan los valores de Hb propuestos por la OMS en 2008. Sin embargo, el valor de Hb o de Hto que indicaría la realización del estudio de la masa eritrocitaria en aquellos pacientes con sospecha clínica de PV o TE no está establecido.

El objetivo de nuestro trabajo fue identificar que parámetro (Hb o Hto) era mejor marcador indirecto de aumento de la masa eritrocitaria, así como identificar el valor de corte de Hb o Hto que indicaría la necesidad de realizar el estudio de la masa eritrocitaria por métodos isotópicos en pacientes con sospecha diagnóstica de PV o TE. Este valor de corte fue investigado en 179 pacientes con diagnóstico de sospecha de PV o TE. El Hto mostró mayor exactitud diagnóstica que la Hb como marcador indirecto de aumento de la masa eritrocitaria. Los valores de Hb propuestos por la OMS en 2008 (superiores a 18.5 g/dL y 16.5 g/dL en hombres y mujeres respectivamente) presentaron una alta especificidad, indicando que el estudio de la masa eritrocitaria puede omitirse en estos casos. Sin embargo, estos valores presentaban una baja sensibilidad, con un 46% de falsos negativos, dejando un importante porcentaje de pacientes sin diagnosticar. El mejor valor de Hto para indicar el estudio de la masa eritrocitaria fue de 0.50 L/L en hombres (75% especificidad, 87.5% sensibilidad) y 0.48 L/L en mujeres (73% especificidad, 94% sensibilidad). Disminuyendo el valor de Hto a 0.48 L/L en hombres se incrementa la sensibilidad a más del 95%. El estudio de la masa eritrocitaria en pacientes con sospecha clínica de PV o TE debería realizarse, por tanto, en aquellos pacientes con valores de Hto entre 0.48 L/L y 0.52 L/L.

3.3.2 Copia del artículo

Se adjunta en anexo 1.

4

DISCUSIÓN

4.1 TRABAJO 1. PAPEL DE LA ERITROPOYETINA SÉRICA Y DE LA CARGA ALÉLICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA POLICITEMIA VERA.

En nuestro trabajo evaluamos la exactitud diagnóstica de la EPO sérica y de la carga alélica de *JAK2V617F* como marcadores de PV. Este es el primer estudio que evalúa simultáneamente ambos parámetros como criterios diagnósticos de PV. Según la clasificación de la OMS los niveles de EPO sérica son un criterio menor de PV (Tefferi et al, 2007). La inclusión de este criterio diagnóstico estuvo basada en múltiples estudios realizados previamente a la descripción de la mutación de *JAK2V617F* (Birgegard & Wide, 1992; Mossuz et al, 2004) por lo que el valor diagnóstico de unos niveles de EPO sérica bajos en presencia de la determinación de la mutación de *JAK2V617F* es desconocido.

En el presente estudio hemos observado que la EPO baja es un buen marcador de PV y que es de ayuda para diferenciar la PV de la eritrocitosis no clonal y de la TE. Es importante destacar que este resultado se observó solo cuando se usaba el ensayo inmunoluminiscente (EIQ) para medir la EPO; por el contrario, el radioinmunoensayo (RIA) mostraba peor precisión diagnóstica. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos que demostraban la utilidad de la EPO para diferenciar entre las policitemias primarias y secundarias y, en un grado menor, con la TE (Birgegard & Wide, 1992; Messinezy et al, 1995, 2002; Remacha et al, 1997; Carneskog et al, 1998; Mossuz et al, 2004) aunque se debe destacar que el papel de la EPO en el diagnóstico de la PV ha estado vinculado a las mejoras en los métodos de medida de ésta (Lindstedt & Lundberg, 1998). En este aspecto, nuestros resultados muestran que el EIQ debe ser el método de elección. Sin embargo, debe mencionarse que estos dos métodos no se compararon en la misma cohorte de pacientes porque ambos se utilizaron en diferentes periodos de tiempo.

Actualmente, existe un creciente interés en la cuantificación de *JAK2V617F* debido a sus implicaciones diagnósticas y pronósticas. Múltiples estudios han sugerido la utilidad de la cuantificación de la carga alélica para distinguir los diferentes subtipos de NPM. En la serie de pacientes descrita por Larsen et al (2007) la mediana de la carga alélica en leucocitos no fraccionados fue de 23% y 7% en la PV y en la TE, respectivamente ($p=0.001$), mientras que Vannucchi et al (2008a) reportaron cargas mutacionales en granulocitos de 48% y 26% en PV y TE, respectivamente ($p < 0.0001$). En nuestra serie, las medianas de la carga alélica de *JAK2V617F* en granulocitos fue de 59% en PV y 23% en TE. Usando la cuantificación de *JAK2V617F* como posible marcador de PV, observamos que la precisión diagnóstica fue muy alta tanto en la cohorte total de pacientes como en los diferentes subgrupos analizados, indicando que la cuantificación de la carga alélica de *JAK2V617F* puede ser de utilidad para diferenciar la PV de la TE.

A pesar de los esfuerzos para estandarizar la cuantificación de la mutación de *JAK2V617F*, el principal inconveniente de la cuantificación de la carga alélica de *JAK2V617F* es la variación entre laboratorios, lo que dificulta la selección de un punto de corte como marcador de PV (Jovanovic et al, 2013). En nuestra serie de pacientes escogimos el punto de corte arbitrario de *JAK2V617F* >35% como marcador de PV. Este valor fue escogido porque presentaba una alta especificidad, que se acercaba al 100%, y mantenía una sensibilidad del 80%. Sin embargo, la estandarización de las técnicas de cuantificación de *JAK2* es obligatoria para que esta propuesta pueda ser usada en la práctica clínica. Por otra parte, algunos estudios han descrito cargas alélicas superiores en hombres que en mujeres (Larsen et al, 2007; Stein et al, 2010), hecho que podría ser atribuido a la mayor proporción de mujeres con TE (Larsen et al, 2007) o a la menor frecuencia de eventos de recombinación mitótica en mujeres que en hombres (Stein et al, 2010). Debe mencionarse que en nuestra serie no pudimos demostrar diferencias significativas en la carga alélica de *JAK2V617F* entre géneros.

Es importante destacar que no hay estudios que evalúen la precisión diagnóstica de los criterios diagnósticos de la OMS 2008 y del BCSH (McMullin et al, 2007; Tefferi et al, 2007). Nosotros hemos demostrado que los criterios diagnósticos de la OMS 2008 tienen una inadecuada precisión diagnóstica por su baja sensibilidad, como resultado de los altos niveles de Hb requeridos para el diagnóstico. Este hecho ya ha sido observado en estudios previos y en estos casos la determinación de la masa eritrocitaria ha sido necesaria para conseguir el diagnóstico correcto (Johansson et al, 2005; Cassinat et al 2008; Álvarez-Larrán et al, 2012a). Por el contrario, el valor de Hto tiene mejor sensibilidad que los valores de Hb definidos por la OMS. De acuerdo con esto, los criterios del BCSH (McMullin et al, 2007) presentan una adecuada precisión diagnóstica usando solo el Hto y la determinación cualitativa de *JAK2V617F*. Sin embargo, cabe destacar que existe una proporción de pacientes difíciles de clasificar usando estos criterios pragmáticos si no se realiza el estudio de la masa eritrocitaria (Álvarez-Larrán et al, 2012a).

Algunos autores han argumentado que la determinación de la EPO es redundante si el paciente presenta la mutación de *JAK2* (Spivak & Silver, 2008) y por lo tanto puede no ser necesario incluir ambas pruebas para el diagnóstico de la PV *JAK2* positiva, tal como es requerido en la clasificación de la OMS. De acuerdo con esta propuesta, nosotros hemos demostrado que la adición de la EPO a los criterios diagnósticos del BCSH no mejora la precisión diagnóstica, lo que indica que la EPO no es necesaria para el diagnóstico de PV si la mutación de *JAK2* está presente. De la misma forma, la precisión diagnóstica no mejora cuando se añade la carga mutacional de *JAK2V617F* a los criterios del BCSH. Sólo la adición de ambos parámetros -EPO baja y carga mutacional alta- mejora ligeramente la

precisión diagnóstica. Este último hallazgo puede explicarse por la pequeña proporción de pacientes con PV que tienen una EPO normal y una carga alélica alta y una EPO baja con una carga alélica baja. Estos pacientes serían clasificados como falsos negativos si solo se incorpora una de estas variables a los criterios diagnósticos, lo que resultaría en una baja sensibilidad.

En conclusión, y desde una perspectiva clínica, el Hto y la determinación cualitativa de *JAK2V617F*, tal como propone el BCSH (McMullin et al, 2007), tienen una buena precisión diagnóstica ya que son criterios simples y fácilmente reproducibles. La precisión diagnóstica de los criterios de PV puede mejorarse ligeramente con la adición de los niveles de EPO y la cuantificación de la carga alélica de *JAK2V617F*.

4.2 TRABAJO 2. CRITERIOS HISTOLÓGICOS OMS DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS: REPRODUCTIBILIDAD, EXACTITUD DIAGNÓSTICA Y CORRELACIÓN CON LAS MUTACIONES GENÉTICAS Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.

Las características histológicas de la BMO han ido ganando protagonismo en los nuevos criterios diagnósticos de la OMS (Tefferi et al, 2007; Arber et al, 2016). Sin embargo, muchos autores han cuestionado la utilidad y la reproducibilidad de estos criterios, especialmente en la distinción entre la fase prefibrótica de la MFP y la TE (Wilkins et al, 2008; Brousseau et al, 2010; Buhr et al, 2012). En el estudio más amplio del tema, tres patólogos revisaron las biopsias de médula ósea de 370 pacientes diagnosticados prospectivamente de TE según los criterios del PVSG (Wilkins et al, 2008). Empleando una refinada metodología estadística, los autores reportan una variación interobservador significativa cuando se realiza el diagnóstico histológico y se evalúan 16 características celulares incluyendo la morfología de los megacariocitos. Otros autores, evaluando menos parámetros, alcanzan conclusiones similares, cuestionando si la forma prefibrótica de la MFP tiene suficiente peso como para ser considerada una entidad clínico-patológica (Brousseau et al, 2010; Buhr et al, 2012). Por otra parte, algunos grupos han reproducido los criterios diagnósticos de la OMS en el diagnóstico de las NMP y reportan una evidencia de que los pacientes con la forma prefibrótica de la MFP presentan una peor supervivencia y un riesgo mayor de transformación a mielofibrosis apoyando con estos datos la separación de estos grupos de pacientes (Barbui et al, 2011b, 2012; Koopmans et al, 2011; Thiele et al, 2011; Gianelli et al, 2014).

El presente estudio ha demostrado la subjetividad existente en la evaluación de ciertas características histológicas, como la morfología de los megacariocitos. Esta variación se relacionó con la existencia de un sesgo de sobrevaloración de la fibrosis por parte de uno de los patólogos. Sólo la evaluación de la hiperplasia megacariocítica y la osteoesclerosis obtuvieron una excelente reproducibilidad. En contraste con lo observado en estudios previos (Wilkins et al, 2008), nosotros no pudimos alcanzar un grado de acuerdo alto en la evaluación del grado de fibrosis reticulínica. Éste es un aspecto importante dado que probablemente es el parámetro clave para diferenciar la TE de la MFP, y algunos autores lo han propuesto como factor de riesgo de progresión a mielofibrosis (Campbell et al, 2009). Un enfoque alternativo para mejorar la precisión diagnóstica podría ser la imagen digital. En este sentido, Teman et al (2010) han propuesto una técnica automatizada que estandariza la evaluación de la fibrosis. Además, recientemente se ha sugerido que es necesaria una definición más precisa de la fase prefibrótica de la MFP y que las mediciones morfométricas de los megacariocitos se deberían estandarizar (Barosi et al, 2014).

Sin embargo, éste y otros estudios han demostrado la gran dificultad de llevar a cabo esta estandarización en el diagnóstico clínico de rutina.

En el presente trabajo hemos analizado la correlación entre la histología de la médula ósea y el estado mutacional de la *CALR*, *JAK2V617F* y *MPL* en una amplia cohorte de pacientes con NMP, siendo el primer estudio en comparar la histología de la TE de acuerdo con el estado mutacional de *CALR* o de *JAK2V617F*. El primer punto a subrayar es que en la mayoría de los casos en los que no había acuerdo entre los dos patólogos o que ambos coincidieron en que se trataba de un caso de NMP inclasificable, todos ellos presentaban la mutación de *JAK2V617F*. Este hecho está en consonancia con los estudios clásicos de pacientes con PV incluidos en los protocolos del PVSG en los que se observaba una amplia variación en la celularidad (media 82%, rango: 37–100%), el número de megacariocitos (media: 62/mm², rango: 12–145) y en la fibrosis reticulínica (normal: 64%, discretamente incrementada: 25%, incremento moderado o marcado: 11%) (Peterson & Ellis, 1995). Estas observaciones revelan que las NMP *JAK2V617F* positivas están asociadas a una histología heterogénea.

Por otra parte, en los pacientes con TE, la presencia de la mutación de *CALR* se asoció con la existencia de acúmulos densos de megacariocitos y con tendencia de las células a presentar alteraciones morfológicas y con proliferación vascular. Estas características hacen que el diagnóstico de la MFP prefibrótica sea más frecuente en aquellos casos con mutación de *CALR*. Estos datos, conjuntamente con las diferencias en algunas variables clínicas como los valores de Hb, el recuento de plaquetas o la frecuencia de trombosis, apoyan la separación de la TE *CALR* positiva como una entidad diferenciada (Rotunno et al, 2014; Rumi et al, 2014). Respecto al diagnóstico histológico, hemos obtenido un buen grado de acuerdo medido con el índice Kappa. Es importante destacar que en los estudios previos que evaluaban este aspecto, el grado de acuerdo variaba de moderado a bueno (Wilkins et al, 2008; Brousseau et al, 2010; Koopmans et al, 2011; Buhr et al, 2012; Gianelli et al, 2014). Las diferencias observadas entre estos estudios pueden ser atribuidas a la experiencia de los patólogos, el grado de compromiso con los postulados propugnados por la OMS, la ausencia en la clasificación actual de una guía explícita para diferenciar estas dos entidades histológicas o el peso que cada patólogo atribuye a las diferentes características histológicas en el momento de hacer el diagnóstico. En este sentido, Brousseau et al (2010) propusieron un sistema de puntuación de 0 a 10 resultado de la suma de diferentes características histológicas. Los pacientes con una puntuación ≤ 3 corresponderían a verdaderas TE, mientras que aquellos pacientes con una puntuación ≤ 6 corresponderían a una MFP en fase prefibrótica. Sin embargo, los mismos autores concluyeron que existía una zona gris que comprendía aquellos pacientes con puntuaciones de 4–5 que no podían ser

diferenciados. Finalmente, es importante mencionar que no existen estudios que alcancen un grado de acuerdo excelente en el diagnóstico histológico. En este sentido, los mismos autores de la clasificación de la OMS afirman que ninguno de los criterios histológicos en el diagnóstico de la PV, la TE y la MFP son suficientes para establecer el diagnóstico y que para éste es necesaria la valoración conjunta de los datos clínicos y de laboratorio (Vardiman et al, 2009).

En este contexto, se debe destacar la ausencia de estudios que evalúen la precisión diagnóstica de la histología mediante la evaluación de la sensibilidad y la especificidad de los criterios OMS para las NMP (Tefferi et al, 2007). Este aspecto es especialmente sencillo de evaluar en la PV dado que en muchos pacientes se puede llegar al diagnóstico sin la necesidad de la BMO. Aprovechando este hecho, hemos evaluado la precisión diagnóstica de la histología en la PV y hemos observado que la histología de la médula ósea presenta una alta especificidad, pero una baja sensibilidad. Esta baja sensibilidad puede ser explicada porque en las BMO de una alta proporción de pacientes diagnosticados de PV usando los criterios clínicos y de laboratorio, no hubo acuerdo entre los dos patólogos o ambos coincidieron en que se trataba de un caso de NMP inclasificable. Esto indica claramente que la histología de médula ósea no puede ser incluida como un criterio mayor de PV y debería reservarse como criterio menor para casos seleccionados, como en aquellos pacientes que no presentan las mutaciones de *JAK2* (V617F o exón 12). Este hecho contrasta con la reciente propuesta de criterios diagnósticos de la PV en la que la histología está incluida en los criterios mayores (Arber et al, 2016). El papel de la histología en la TE es controvertido, no solo por la distinción entre la variante prefibrótica de la MFP, sino también por las implicaciones pronósticas de los hallazgos histológicos. De forma similar a lo que ocurre en la PV, la histología de la TE está asociada con una baja sensibilidad pero alta especificidad, lo que indica que la evaluación de la médula ósea puede no ser diagnóstica en una proporción importante de pacientes con un cuadro clínico característico de TE. Dado que la variante prefibrótica de la mielofibrosis está asociada a diferencias en el pronóstico y la supervivencia, la identificación de esta entidad puede ser útil. Sin embargo, teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la histología en la TE y el bajo número de pacientes con TE que evolucionan a mielofibrosis, la identificación de la variante prefibrótica de la mielofibrosis tiene un impacto limitado en la adopción de una estrategia terapéutica específica. No obstante, expertos hematopatólogos defienden la precisión y el valor pronóstico de la histología medular en el diagnóstico de las NMP.

Finalmente, hemos observado un riesgo mayor de transformación a mielofibrosis en aquellas TE con mutación en *MPL*. Este hallazgo contrasta con trabajos previos que incluían un mayor número de pacientes en los que la TE con mutación de *MPL* mostraba unas

características histológicas similares a las TE con mutación de *JAK2V617F* y no se observaban diferencias en el número de trombosis y probabilidad de transformación (Beer et al, 2008; Vannucchi et al, 2008b). Dado que nuestro estudio sólo incluía cinco casos de TE con mutación de MPL, no puede descartarse que estos resultados se deban al azar, sin embargo, estudios recientes también describen mayores frecuencias de mielofibrosis post-TE con mutación de MPL (Elala et al, 2016).

En conclusión, los criterios histológicos de la OMS para la clasificación de las NMP tienen una baja reproducibilidad debido a la variación inter-observador. Consecuentemente, la precisión diagnóstica de la histología es pobre debido a su baja sensibilidad. Los pacientes positivos para la mutación de *JAK2V617F* presentan una histología heterogénea mientras que las TE *CALR* positivas se asocian frecuentemente a acúmulos de megacariocitos que muestran atípicas morfológicas.

4.3 TRABAJO ADICIONAL. MEDICIÓN DE LA MASA ERITROCITARIA EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE SOSPECHA CLÍNICA DE POLICITEMIA VERA O TROMBOCITEMIA ESENCIAL.

En nuestro estudio evaluamos la precisión diagnóstica de la Hb y del Hto para predecir el aumento de la masa eritrocitaria en pacientes con sospecha diagnóstica de PV o TE. El punto de corte de Hb propuesto por la OMS 2008 como criterio diagnóstico de PV mostró una elevada especificidad, indicando que presentar valores de Hb superiores a 18.5 g/dL en hombres y superiores a 16.5 g/dL en mujeres son un marcador indirecto adecuado del aumento de la masa eritrocitaria en pacientes con sospecha diagnóstica de PV y TE. Considerando este punto de corte, ningún hombre con Hb superior a 18.5 g/dL presentó una masa eritrocitaria normal y solo dos mujeres con Hb superior a 16.5 g/dL presentaron una masa eritrocitaria normal. Sin embargo, estos valores de Hb mostraron muy baja sensibilidad, dando lugar a 53 falsos negativos de un total de 114 pacientes (46%), en los que la Hb al diagnóstico estaba por debajo del punto de corte definido por la OMS 2008, pero la masa eritrocitaria estaba aumentada. Dichos pacientes no se habrían diagnosticado nunca de PV con los criterios OMS 2008 si no se hubiese medido la masa eritrocitaria. Cuarenta de estos 53 pacientes (75%) presentaban trombocitosis, por lo que probablemente estos casos serían erróneamente diagnosticados de TE.

Se realizaron curvas ROC con la intención de evaluar que parámetro en sangre es mejor para identificar la necesidad de realizar la determinación de la masa eritrocitaria. El Hto mostró una área bajo la curva (AUC) mayor, por lo que la precisión diagnóstica del Hto para predecir el incremento de la masa eritrocitaria demostró ser mejor en el total de nuestra serie de pacientes. Cuando se estratificaba de acuerdo con el género, la precisión diagnóstica de la Hb y del Hto fue similar en hombres, mientras que en mujeres la precisión diagnóstica del Hto fue mejor que la de la Hb. Estos hallazgos indican que en general el Hto debería ser una mejor guía que la Hb para decidir si se realiza el estudio de la masa eritrocitaria. En mujeres, un Hto superior a 0.52 L/L mostró una especificidad de 95% y sólo dos casos de los 31 que tenían estos valores presentaban una masa eritrocitaria normal. Este dato sugiere que el Hto superior a 0.52 L/L puede ser usado como marcador del incremento de la masa eritrocitaria y consecuentemente en estos casos puede prescindirse de la determinación de la masa eritrocitaria. Por el contrario, si no se realiza el estudio de la masa eritrocitaria en pacientes con Hto inferior a 0.52 L/L, no se puede establecer el diagnóstico de PV en 21 de 60 mujeres en las que la masa eritrocitaria estaría aumentada. Disminuyendo el valor de Hto a 0.45 L/L o 0.48 L/L se incrementaría la sensibilidad a 98% y 95%, respectivamente, y el número de falsos positivos sería de 28 y 11, respectivamente. Estos resultados sugieren que en mujeres el estudio de la masa eritrocitaria tendría mejor rendimiento diagnóstico en

el diagnóstico diferencial de la TE con la PV en aquellos casos con hematocritos entre 0.45 y 0.52 L/L. En hombres, el Hto superior a 0.52 L/L tenía una especificidad de 96% que sería equivalente a un incremento de la masa eritrocitaria. Aquellos pacientes con sospecha diagnóstica de PV o de TE que tengan un Hto entre 0.48 L/L y 0.52 L/L podrían beneficiarse del estudio de la masa eritrocitaria, como muestra la sensibilidad del 95% para valores de Hto superiores a 0.48 L/L. Si la determinación de la masa eritrocitaria no se realiza en pacientes con Hto inferior a 0.52 L/L, 12 casos no podrían ser diagnosticados de PV. La realización del estudio de masa eritrocitaria en aquellos casos con valores de Hto entre 0.48 L/L y 0.52 L/L habría evitado un diagnóstico erróneo.

Debe señalarse que nuestra serie estaba restringida a pacientes con diagnóstico final de PV y TE. La distinción entre PV y policitemia aparente no se evalúa en el presente estudio. Como consecuencia, los puntos de corte de Hb y Hto propuestos pueden no ser apropiados en pacientes con eritrocitosis aislada y sin características que sugieran la presencia de una neoplasia mieloproliferativa como la trombocitosis o la mutación de *JAK2*. Otro aspecto a tener en consideración es que el Hto fue medido con analizadores automáticos, a diferencia de estudios previos en los que el Hto fue medido por centrifugación directa de sangre anticoagulada (Johansson et al, 2005).

Una posible crítica a la metodología usada en nuestro estudio es que se realizó el estudio de la masa eritrocitaria de forma sistemática como procedimiento diagnóstico en pacientes con sospecha de PV y TE cuando el Hto era superior a 0.45 en hombres y superior a 0.42 en mujeres. Se podría argumentar que este criterio para medir la masa eritrocitaria limita la posibilidad de identificar valores inferiores de Hb y Hto en los que la determinación de la masa eritrocitaria debería realizarse. A este respecto, la presencia de datos clínicos que sugieran la presencia de una PV oculta o inaparente, como la esplenomegalia, la leucocitosis, la trombocitosis o la trombosis venosa, se han propuesto como marcadores para indicar el estudio de la masa eritrocitaria en pacientes con valores de Hb o de Hto normales (Lamy et al, 1997). Además, teniendo en cuenta los datos de este estudio y de otros estudios realizados previamente y considerando los criterios de la OMS 2008, la presencia de microcitosis, cargas alélicas altas de *JAK2V617F*, niveles de EPO sérica bajos o la histología de la médula ósea pueden ayudar a los clínicos a decidir si la masa eritrocitaria se debe realizar o no en los casos con valores de Hb o de Hto normales (Vannucchi et al, 2007a y b; Messinezy et al, 2002; Westwood & Pearson, 1996; Spivack & Silver, 2008). En conclusión, el valor de corte propuesto por la OMS en 2008 como criterio diagnóstico de PV tiene una baja sensibilidad y deja a un importante número de casos diagnosticados erróneamente como TE. Esta imprecisión diagnóstica puede mejorarse si se realiza el estudio de la masa eritrocitaria en aquellos casos con sospecha de PV o TE con valores de Hto entre 0.48 L/L y 0.52 L/L.

5

CONCLUSIONES

1. El Hto es mejor que la Hb como marcador indirecto de una masa eritrocitaria aumentada.
2. La sensibilidad de los valores de Hb establecidos por los criterios OMS 2008 es muy baja, lo que ocasiona un importante número de falsos negativos. Esta inexactitud diagnóstica puede mejorarse realizando el estudio de la masa eritrocitaria.
3. El estudio de la masa eritrocitaria debería realizarse en aquellos pacientes con sospecha diagnóstica de TE o PV que presentan unos valores de Hto entre 0.48-0.52 L/L
4. Los criterios BSCH constituyen una forma sencilla y fiable para establecer el diagnóstico de PV.
5. Aunque tanto la EPO como la carga alélica de *JAK2V617F* son buenos marcadores de PV, su adición a los criterios diagnósticos mejoran sólo discretamente la exactitud diagnóstica.
6. Los criterios histológicos de la OMS para la clasificación de las NMP tienen una baja reproductibilidad debido a una importante variación inter-observador. En consecuencia, la exactitud diagnóstica de la histología es escasa debido a su baja sensibilidad.

ANEXO 1

Trabajo adicional: Medición de la masa eritrocitaria en pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de policitemia vera o trombocitemia esencial.

Álvarez-Larrán, A., Ancochea, A., Angona A., Pedro, C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Bellosillo, B., Besses, C. (2012) Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, 97(11), 1704-7.

ANEXO 2

Precisión diagnóstica de los valores de corte de hemoglobina y hematocrito de la OMS 2016.

Ante la reciente propuesta de la OMS 2016 consideramos necesario ampliar el trabajo 1 analizando, en la misma cohorte de pacientes, la precisión diagnóstica de los nuevos valores de corte de Hb y Hto como predictores del aumento de la masa eritrocitaria.

Se incluyeron 179 pacientes (91 mujeres y 88 hombres) con sospecha diagnóstica de PV o TE y se realizaron las curvas ROC, el AUC. La sensibilidad y la especificidad de dichos puntos puede observarse en la siguiente tabla:

Tabla: Precisión diagnóstica de diferentes valores de Hb y de Hto como marcadores de aumento de la masa eritrocitaria.

	AUC	S (%)	E (%)
Hombres			
Hb >18.5 (OMS 2008)	0.906	58%	100%
Hb > 16.5 (OMS 2016)	0.906	84%	82%
Hto > 52% (BCSH)	0.919	81%	96%
Hto >49% (OMS 2016)	0.919	87%	75%
Mujeres			
Hb >16.5 g/dL(OMS 2008)	0.874	48%	95%
Hb > 16.0 g/dL (OMS 2016)	0.874	58%	99%
Hto >48% (BCSH y OMS 2016)	0.922	94%	78%

En la propuesta de criterios OMS 2016, los valores de Hb y de Hto para hombres, así como el valor de Hto para mujeres, mostraron buena sensibilidad y especificidad, sin embargo el valor de Hb para mujeres presentó una sensibilidad muy baja por lo que no sería adecuado como marcador indirecto de masa eritrocitaria elevada. Cabe destacar, que en nuestra serie el punto de corte propuesto por el BCSH para el Hto en varones fue claramente superior al de la OMS 2016. A partir de estos resultados podemos concluir que es mejor utilizar el Hto que la Hb como marcador de masa eritrocitaria aumentada en pacientes con sospecha de PV o TE y que los valores de Hto propuestos tanto por la OMS 2016 como el BCSH tienen una exactitud diagnóstica adecuada.

A partir de la cohorte de pacientes del trabajo 2 se ha evaluado la precisión diagnóstica de los valores de corte de Hb y Hto propuestos por la OMS 2016 como marcadores de PV. Se ha evaluado la precisión diagnóstica de estos puntos de corte en 2 subgrupos de pacientes: pacientes con mutación de *JAK2V617F* donde se incluían pacientes con PV y TE que presentaban la mutación (n=78) y finalmente un tercer grupo de pacientes con NMP que incluía a aquellos pacientes con diagnóstico de PV y TE independientemente de su estado mutacional (n=100). En la tabla que se muestra a continuación pueden observarse los valores de AUC, la sensibilidad y la especificidad de estos dos subgrupos.

Tabla: Precisión diagnóstica de diferentes valores de Hb y de Hto como marcadores de PV.

NMP <i>JAK2</i> positiva			
	AUC	S (%)	E (%)
Hombres			
Hb > 18.5 (OMS 2008)	0.883	45%	100%
Hb > 16.5 (OMS 2016)	0.883	74.5%	89%
Hto > 52% (BCSH)	0.919	71%	100%
Hto > 49% (OMS 2016)	0.919	82%	89%
Mujeres			
Hb > 16.5 g/dL(OMS 2008)	0.880	44%	100%
Hb > 16.0 g/dL (OMS 2016)	0.880	56%	98%
Hto > 48% (BCSH y OMS 2016)	0.903	89%	93%
NMP confirmada independiente del estado mutacional de <i>JAK2</i>			
	AUC	S (%)	E (%)
Hombres			
Hb > 18.5 (OMS 2008)	0.909	47%	100%
Hb > 16.5 (OMS 2016)	0.909	76%	99%
Hto > 52% (BCSH)	0.941	74%	100%
Hto > 49% (OMS 2016)	0.941	84.5%	99%
Mujeres			
Hb > 16.5 g/dL(OMS 2008)	0.890	41%	100%
Hb > 16.0 g/dL (OMS 2016)	0.890	51%	99%
Hto > 48% (BCSH y OMS 2016)	0.918	88%	94%

De nuevo, el Hto resultó ser superior a la Hb como criterio diagnóstico de PV. Los valores de Hto propuestos por la OMS 2016 mostraron una buena exactitud diagnóstica mejorando con creces los criterios de la OMS 2008. En comparación con los criterios de BCSH, la propuesta OMS 2016 mejora la sensibilidad y por tanto reduciría el número de falsos negativos.

6

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, J.W., Fialkow, P.J., Murphy, S., Prchal, J.F., Steinmann, L. (1976) Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *The New England Journal of Medicine*, 295, 913-916.
- Álvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Martínez-Avilés, L., Saumell, S., Salar, A., Abella, E., Gimeno, E., Serrano, S., Florensa, L., Sánchez, B., Pedro, C., Besses, C. (2009) Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *British Journal of Haematology*, 146, 504-509.
- Álvarez-Larrán, A., Ancochea, A., Angona, A., Pedro, C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Bellosillo, B., Besses, C. (2012a) Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, 97, 1704-1707.
- Álvarez-Larrán, A., Pereira, A., Cervantes, F., Arellano-Rodrigo, E., Hernández-Boluda, J.C., Ferrer-Marín, F., Angona, A., Gómez, M., Muiña, B., Guillén, H., Teruel, A., Bellosillo, B., Burgaleta, C., Vicente, V., Besses, C. (2012b) Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*. 119(6), 1363-9.
- Álvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Pereira, A., Kerguelen, A., Hernández-Boluda, J.C., Martínez-Avilés, L., Fernández-Rodríguez, C., Gómez, M., Lombardía, L., Angona, A., Ancochea, A., Senín, A., Longarón, R., Navarro, B., Collado, M., Besses, C. (2014a) JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *American Journal of Hematology*, 89, 517-523.
- Álvarez-Larrán, A., Martínez-Avilés, L., Hernández-Boluda, J.C., Ferrer-Marín, F., Antelo, M.L., Burgaleta, C., Mata, M.I., Xicoy, B., Martínez-Trillos, A., Gómez-Casares, M.T., Durán, M.A., Marcote, B., Ancochea, A., Senín, A., Angona, A., Gómez, M., Vicente, V., Cervantes, F., Bellosillo, B., Besses, C. (2014b) Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Annals of Hematology*, 93(12), 2037-43.
- Álvarez-Larrán, A., Angona, A., Ancochea, A., García-Pallarols, F., Fernández, C., Longarón, R., Bellosillo, B., Besses, C. (2016a) Masked polycythaemia vera: presenting features, response to treatment and clinical outcomes. *European Journal of Haematology*, 96(1), 83-9.
- Álvarez-Larrán, A., Kerguelen, A., Hernández-Boluda, J.C., Pérez-Encinas, M., Ferrer-Marín, F., Báñez, A., Martínez-López, J., Cuevas, B., Mata, M.I., García-Gutiérrez, V., Aragües, P., Montesdeoca, S., Burgaleta, C., Caballero, G., Hernández-Rivas, J.A., Durán, M.A., Gómez-Casares, M.T., Besses, C.; Grupo Español de Enfermedades

- Mieloproliferativas Filadelfia Negativas (GEMFIN). (2016b) Frequency and prognostic value of resistance/intolerance to hydroxycarbamide in 890 patients with polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 172(5),786-93.
- Anagrelide Study Group. (1992) Anagrelide, a therapy for thrombocythemic states: experience in 577 patients. *American Journal of Medicine*, 92(1), 69-76.
- Ancochea, A., Alvarez-Larrán, A., Morales-Indiano, C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Angona, A., Senín, A., Bellosillo, B., Besses, C. (2014) The role of serum erythropoietin level and *JAK2* V617F allele burden in the diagnosis of polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 167, 411-417.
- Anderson, W.F., Beckman, B., Beltran, G., Fisher, J.W., Stuckey, W.J. (1982) Erythropoietin-independent erythroid colony formation in patients with erythroleukaemia (M6) and related disorders. *British Journal of Haematology*, 52, 311-7.
- Andrieux, J.L., Demory, J.L. (2005) Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Current Hematology Reports*, 4(3), 224–229.
- Angona, A., Álvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Marínez-Avilés, L., Camacho, L., Fernandez-Rodríguez, C., Pairet, S., Longarón, R., Ancochea, A., Senín, A., Florensa, L., Besses, C. (2014) Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations, and evolutionary pattern of *JAK2*V617F allele burden in polycythemia vera. *European Journal of Haematology*, 251-7.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-405.
- Balan, K.K., Critchley, M. (1997) Outcome of 259 patients with primary proliferative polycythaemia (PPP) and idiopathic thrombocythaemia (IT) treated in a regional nuclear medicine department with phosphorus-32--a 15 year review. *The British Journal of Radiology*, 70(839), 1169-73.
- Baldo, A., Sammarco, E., Plaitano, R., Martinelli, V., Monfrecola. (2002) Narrowband (TL-01) ultraviolet B phototherapy for pruritus in polycythaemia vera. *The British Journal of Dermatology*, 147, 979-81.
- Barbui, T., Carobbio, A., Rambaldi, A., Finazzi, G. (2009) Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood*, 114, 759-763.

- Barbui, T., Barosi, G., Birgegard, G., Cervantes, F., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H.C., Hehlmann, R., Hoffman, R., Kiladjan, J.J., Kröger, N., Mesa, R., McMullin, M.F., Pardanani, A., Passamonti, F., Vannucchi, A.M., Reiter, A., Silver, R.T., Verstovsek, S., Tefferi, A.; European LeukemiaNet. (2011a) Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 761-70.
- Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., d'Amore, E.S., Randi, M.L., Bertozzi, I., Marino, F., Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Carrai, V., Gisslinger, H., Buxhofer-Ausch, V., Müllauer, L., Carobbio, A., Gianatti, A., Gangat, N., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2011b) Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 3179–3184.
- Barbui, T., Thiele, J., Carobbio, A., Passamonti, F., Rumi, E., Randi, M.L., Bertozzi, I., Vannucchi, A.M., Gisslinger, H., Gisslinger, B., Finazzi, G., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Rambaldi, A., Gangat, N. & Tefferi, A. (2012) Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. *Blood*, 120, 569– 571.
- Barbui, T., Finazzi, G., Falanga, A. (2013) Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*, 122(13), 2176-84.
- Barbui, T., Thiele, J., Carobbio, A., Gisslinger, H., Finazzi, G., Rumi, E., Luigia Randi, M., Vannucchi, A.M., Gisslinger, B., Müllauer, L., Ruggeri, M., Rambaldi, A., Tefferi, A. (2014a) Masked polycythemia vera diagnosed according to WHO and BCSH classification. *American Journal of Hematology*, 89(2), 199-202.
- Barbui, T., Thiele, J., Gisslinger, H., Finazzi, G., Carobbio, A., Rumi, E., Luigia Randi, M., Bertozzi, I., Vannucchi, A.M., Pieri, L., Carrai, V., Gisslinger, B., Müllauer, L., Ruggeri, M., Rambaldi, A., Tefferi, A. (2014b) Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study. *American Journal of Hematology*, 89(1), 52-4.
- Barosi, G., Mesa, R.A., Thiele, J., Cervantes, F., Campbell, P.J., Verstovsek, S., Dupriez, B., Levine, R.L., Passamonti, F., Gotlib, J., Reilly, J.T., Vannucchi, A.M., Hanson, C.A., Solberg, L.A., Orazi, A., Tefferi, A.; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). (2008) Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*, 22(2), 437-8.

- Barosi, G., Birgegard, G., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H.C., Kiladjan, J.J., Lengfelder, E., McMullin, M.F., Passamonti, F., Reilly, J.T., Vannucchi, A.M., Barbui, T. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*, 113(20), 4829-33.
- Barosi, G., Birgegard, G., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H., Kiladjan, J.J., Lengfelder, E., Mesa, R., Mc Mullin, M.F., Passamonti, F., Reilly, J.T., Vannucchi, A.M., Barbui, T. (2010) A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *British Journal of Haematology*, 148(6), 961-3.
- Barosi, G., Mesa, R., Finazzi, G., Harrison, C., Kiladjan, J.J., Lengfelder, E., McMullin, M.F., Passamonti, F., Vannucchi, A.M., Besses, C., Gisslinger, H., Samuelsson, J., Verstovsek, S., Hoffman, R., Pardanani, A., Cervantes, F., Tefferi, A., Barbui, T. (2013) Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood*, 121(23), 4778-81.
- Barosi, G., Vannucchi, A.M., De Stefano, V., Pane, F., Passamonti, F., Rambaldi, A., Saglio, G., Barbui, T. & Tura, S. (2014) Identifying and addressing unmet clinical needs in Ph-neg classical myeloproliferative neoplasms: a consensusbased SIE, SIES, GITMO position paper. *Leukemia Research*, 38, 155-160.
- Bartl, R., Frisch, B., Wilmanns, W. (1993) Potential of bone marrow biopsy in chronic myeloproliferative disorders (MPD). *European Journal of Haematology*, 50, 41-52.
- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott, M.A., Erber, W.N., Green, A.R.; Cancer Genome Project. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365, 1054-1061.
- Beer, P.A., Campbell, P.J., Scott, L.M., Bench, A.J., Erber, W.N., Bareford, D., Wilkins, B.S., Reilly, J.T., Hasselbalch, H.C., Bowman, R., Wheatley, K., Buck, G., Harrison, C.N., Green, A.R. (2008) MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*, 112(1), 141-9.
- Bellosillo, B., Martínez-Avilés, L., Gimeno, E., Florensa, L., Longarón, R., Navarro, G., Salar, A., Espinet, B., Solé, F., Serrano, S., Besses, C. (2007) A higher JAK2 V617F-mutated clone is observed in platelets than in granulocytes from essential thrombocythemia patients, but not in patients with polycythemia vera and primary myelofibrosis. *Leukemia*, 21(6), 1331-2.

- Berk, P.D., Goldberg, J.D., Silverstein, M.N., Weinfeld, A., Donovan, P.B., Ellis, J.T., Landaw, S.A., Laszlo, J., Najean, Y., Pisciotta, A.V., Wasserman, L.R. (1981) Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *The New England Journal of Medicine*, 304, 441-447.
- Berlin, N.I. (1975) Diagnosis and classification of the polycythemias. *Seminars in Hematology*, 12, 339-51.
- Birgegard, G. & Wide, L. (1992) Serum erythropoietin in the diagnosis of polycythaemia and after plebotomy treatment. *British Journal of Haematology*, 81, 603-606.
- Bilgrami, S., Greenberg, B.R. (1995) Polycythemia rubra vera. *Seminars in Oncology*. 1995, 22, 307-326.
- Bonicelli, G., Abdulkarim, K., Mounier, M., Johansson, P., Rossi, C., Jooste, V., Andreasson, B., Maynadié, M., Girodon, F. (2013) Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: a population-based study of 327 patients. *British Journal of Haematology*, 160(2), 251-4.
- Brecqueville, M., Rey, J., Bertucci, F., Coppin, E., Finetti, P., Carbuccia, N., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Gisserot, O., Verrot, D., Slama, B., Vey, N., Mozziconacci, M.J., Birnbaum, D., Murati, A. (2012) Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51, 743-755.
- Brousseau, M., Parot-Schinkel, E., Moles, M.P., Boyer, F., Hunault, M., Rousselet, M.C. (2010) Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus pre-fibrotic primary myelofibrosis. *Histopathology*, 56, 758-67.
- Brusamolino, E., Salvaneschi, L., Canevari, A., Bernasconi, C. (1984) Efficacy trial of pipobroman in polycythemia vera and incidence of acute leukemia. *Journal Clinical of Oncology*, 2, 558-561.
- Buhr, T., Hebeda, K., Kaloutsi, V., Porwit, A., Van der Walt, J., Kreipe, H. (2012) European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from pre-fibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica*, 97, 360-5.
- Caldwell, G.G., Kelley, D.B., Heath, C.W. Jr., Zack, M. (1984) Polycythemia vera among participants of a nuclear weapons test. *Journal of the American Medical Association*, 252, 662-664.

- Campbell, P.J., Scott, L.M., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Marsden, J.T., Duffy, A., Boyd, E.M., Bench, A.J., Scott, M.A., Vassiliou, G.S., Milligan, D.W., Smith, S.R., Erber, W.N., Bareford, D., Wilkins, B.S., Reilly, J.T., Harrison, C.N., Green, A.R.; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. (2005) Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 366(9501), 1945-53.
- Campbell, P.J., Green, A.R. (2006) The myeloproliferative disorders. *The New England Journal of Medicine*, 355(23), 2452-66.
- Campbell, P.J., Bareford, D., Erber, W.N., Wilkins, B.S., Wright, P., Buck, G., Wheatley, K., Harrison, C.N. & Green, A.R. (2009) Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 2991-2999.
- Carneskog, J., Kutti, J., Wadenvik, H., Lundberg, P.A. & Lindstedt, G. (1998) Plasma erythropoietin by high-detectability immunoradiometric assay in untreated and treated patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *European Journal of Haematology*, 60, 278-282.
- Carobbio, A., Finazzi, G., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., Dellacasa, C.M., Salmoiraghi, S., Delaini, F., Rambaldi, A., Barbui, T. (2009) JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Experimental Hematology*, 37, 1016-1021.
- Cassinat, B., Laguillier, C., Gardin, C., de Beco, V., Burcheri, S., Fenaux, P., Chomienne, C., Kiladjian, J.J.; PV-Nord Group. (2008) Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass? *Leukemia*, 22(2), 452-3.
- Cervantes, F., Arellano-Rodrigo, E., Alvarez-Larrán, A. (2009) Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 94(11), 1484-8.
- Chen, E., Beer, P.A., Godfrey, A.L., Ortmann, C.A., Li, J., Costa-Pereira, A.P., Ingle, C.E., Dermitzakis, E.T., Campbell, P.J., Green, A.R. (2010) Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell*, 18(5), 524-35.
- Chievitz, E. & Thiede, T. (1962) Complications and causes of death in polycythaemia vera. *Acta Medica Scandinavica*, 172, 513-523.
- Dameshek, W. (1951) Some especulations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6, 372-375.

- Denninger, M.H., Chaït, Y., Casadevall, N., Hillaire, S., Guillin, M.C., Bezeaud, A., Erlinger, S., Briere, J., Valla, D. (2000) Cause of portal or hepatic venous thrombosis in adults: the role of multiple concurrent factors. *Hepatology*, 31, 587-591.
- Diehn, F., Tefferi, A. (2001) Pruritus in polycythaemia vera: prevalence, laboratory correlates and management. *British Journal of Haematology*, 115, 619-21.
- Diez-Martin, J.L., Graham, D.L., Petitt, R.M., Dewald, G.W. (1991) Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clinic Proceedings*, 66(3), 287-99.
- Di Nisio, M., Barbui, T., Di Gennaro, L., Borrelli, G., Finazzi, G., Landolfi, R., Leone, G., Marfisi, R., Porreca, E., Ruggeri, M., Rutjes, A.W., Tognoni, G., Vannucchi, A.M., Marchioli, R.; European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP) Investigators. (2007) The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *British Journal of Haematology*, 136, 249-259.
- Donovan, P.B., Kaplan, M.E., Goldberg, J.D., Tatarsky, I., Najean, Y., Silberstein, E.B., Knospe, W.H., Laszlo, J., Mack, K., Berk, P.D., et al. (1984) Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea. *American Journal of Hematology*, 17, 329-334.
- Dupont, S., Massé, A., James, C., Teyssandier, I., Lécuse, Y., Larbret, F., Ugo, V., Saulnier, P., Koscielny, S., Le Couédic, J.P., Casadevall, N., Vainchenker, W., Delhommeau, F. (2007) The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*, 110(3), 1013-21.
- Elala, Y.C., Lasho, T.L., Gangat, N., Finke, C., Barraco, D., Haider, M., Abou Hussein, A.K., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., Tefferi, A. (2016) Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *American Journal of Hematology*, 91(5), 503-6.
- Ellis, J.T., Silver, R.T., Coleman, M., Geller, S.A. (1975) The bone marrow in polycythemia vera. *Seminars in Hematology*, 12, 433-44.
- Ellis, J.T., Peterson, P. (1979) The bone marrow in polycythemia vera. *Pathology Annual*, 14, 383-403.
- Ellis, J.T., Peterson, P., Geller, S.A. & Rappaport, H. (1986) Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. *Seminars in Hematology*, 23, 144-155.

- Emanuel, R.M., Dueck, A.C., Geyer, H.L., Kiladjan, J.J., Slot, S., Zweegman, S., te Boekhorst, P.A., Commandeur, S., Schouten, H.C., Sackmann, F., Kerguelen Fuentes, A., Hernández-Maraver, D., Pahl, H.L., Griesshammer, M., Stegelmann, F., Doehner, K., Lehmann, T., Bonatz, K., Reiter, A., Boyer, F., Etienne, G., Ianotto, J.C., Ranta, D., Roy, L., Cahn, J.Y., Harrison, C.N., Radia, D., Muxi, P., Maldonado, N., Besses, C., Cervantes, F., Johansson, P.L., Barbui, T., Barosi, G., Vannucchi, A.M., Passamonti, F., Andreasson, B., Ferrari, M.L., Rambaldi, A., Samuelsson, J., Birgegard, G., Tefferi, A., Mesa, R.A. (2012) Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *Journal Clinical of Oncology*, 30(33), 4098-103.
- Eridani, S., Batten, E., Sawyer, B. (1984) Erythroid colony formation in primary thrombocythaemia: evidence of hypersensitivity to erythropoietin. *British Journal of Haematology*, 56, 157-61.
- Finazzi, G., Caruso, V., Marchioli, R., Capnist, G., Chisesi, T., Finelli, C., Gugliotta, L., Landolfi, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Marilus, R., Patrono, C., Pogliani, E.M., Randi, M.L., Villegas, A., Tognoni, G., Barbui, T; ECLAP Investigators. (2005) Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*, 105, 2664-2670.
- Florensa, L., Besses, C., Almarcha, J., Lafuente, R., Palou, L., Pedro, C., Sans-Sabrafen, J., Woessner, S. (1989) Circulating erythroid and megakaryocytic progenitors in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *European Journal of Haematology*, 43, 417-22.
- Fruchtman, S.M., Mack, K., Kaplan, M.E., Peterson, P., Berk, P.D., Wasserman, L.R. (1997) From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Seminars in Hematology*, 34, 17-23.
- Gangat, N., Strand, J., Li, C.Y., Wu, W., Pardanani, A., Tefferi, A. (2007) Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, 138, 354-358.
- Gangat, N., Strand, J., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Pardanani, A., Li, C.Y., Ketterling, R.P., Tefferi, A. (2008) Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *European Journal of Haematology*, 80(3), 197-200.
- García Curiel, A., Gómez Perales, J.L. (2001) Calculation of the blood volume with isotopic dilution. Theoretical and practical review. *Revista Española de Medicina Nuclear*, 20(6), 466-72.

- Gianelli, U., Bossi, A., Cortinovis, I., Sabattini, E., Tripodo, C., Boveri, E., Moro, A., Valli, R., Ponzoni, M., Florena, A., Orcioni, G., Ascani, S., Bonoldi, E., Iurlo, A., Gugliotta, L. & Franco, V. (2014) Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Modern Pathology*, 27, 814–822.
- Gilliland, D.G., Blanchard, K.L., Levy, J., Perrin, S., Bunn, H.F. (1991) Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 6848-6852.
- Giona, F., Teofili, L., Moleti, M.L., Martini, M., Palumbo, G., Amendola, A., Mazzucconi, M.G., Testi, A.M., Pignoloni, P., Orlando, S.M., Capodimonti, S., Nanni, M., Leone, G., Larocca, L.M., Foà, R. (2012) Thrombocytopenia and polycythemia in patients younger than 20 years at diagnosis: clinical and biologic features, treatment, and long-term outcome. *Blood*, 119(10), 2219-27.
- Godfrey, A.L., Chen, E., Pagano, F., Ortmann, C.A., Silber, Y., Bellosillo, B., Guglielmelli, P., Harrison, C.N., Reilly, J.T., Stegelmann, F., Bijou, F., Lippert, E., McMullin, M.F., Boiron, J.M., Döhner, K., Vannucchi, A.M., Besses, C., Campbell, P.J., Green, A.R. (2012) JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood*, 120(13), 2704-7.
- Godfrey, A.L., Chen, E., Pagano, F., Silber, Y., Campbell, P.J., Green, A.R. (2013) Clonal analyses reveal associations of JAK2V617F homozygosity with hematologic features, age and gender in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica*. 98(5), 718-21.
- Gruppo Italiano Studio Policitemia. (1995) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Annals of Internal Medicine*, 123, 656-664.
- Haanen, C., Mathe, G., Hayat, M. (1981) Treatment of polycythaemia vera by radiophosphorus or busulphan: a randomized clinical trial. *British Journal of Cancer*, 44, 75-80.
- Hofmann, I. (2015) Myeloproliferative Neoplasms in Children. *Journal of Hematopathology*, 8(3), 143-157.
- Hultcrantz, M., Kristinsson, S.Y., Andersson, T.M., Landgren, O., Eloranta, S., Derolf, A.R., Dickman, P.W., Björkholm, M. (2012) Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(24), 2995-3001.
- Iland, H.J., Laszlo, J., Peterson, P., Murphy, S., Brière, J., Weinfeld, A., Rosenthal, D.S., Landaw, S.A., Ellis, J.T., Silverstein, M.N., et al. (1983) Essential thrombocythemia: clinical and laboratory characteristics at presentation. *Transactions of the Association of American Physicians*, 96, 165-74.

- James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434, 1144-1148.
- Johansson, P.L., Safai-Kutti, S. & Kutti, J. (2005) An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *British Journal of Haematology*, 129, 701-705.
- Johansson, P. (2006) Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32, 171-173.
- Jones, A.V., Chase, A., Silver, R.T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y.L., Cario, H., Pahl, H.L., Collins, A., Reiter, A., Grand, F., Cross, N.C. (2009) JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics*, 41, 446-449.
- Jovanovic, J.V., Ivey, A., Vannucchi, A.M., Lippert, E., Oppliger Leibundgut, E., Cassinat, B., Pallisgaard, N., Maroc, N., Hermouet, S., Nickless, G., Guglielmelli, P., Van der Reijden, B.A., Jansen, J.H., Alpermann, T., Schnittger, S., Bench, A., Tobal, K., Wilkins, B., Cuthill, K., McLornan, D., Yeoman, K., Akiki, S., Bryon, J., Jeffries, S., Jones, A., Percy, M.J., Schwemmers, S., Gruender, A., Kelley, T.W., Reading, S., Pancrazzi, A., McMullin, M.F., Pahl, H.L., Cross, N.C., Harrison, C.N., Prchal, J.T., Chomienne, C., Kiladjian, J.J., Barbui, T. & Grimwade, D. (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNrEuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia*, 27, 2032-2039.
- Juvonen, E., Ikkala, E., Oksanen, K., Ruutu, T. (1993) Megakaryocyte and erythroid colony formation in essential thrombocythaemia and reactive thrombocytosis: diagnostic value and correlation to complications. *British Journal of Haematology*, 83, 192-7.
- Kennedy, J.A., Atenafu, E.G., Messner, H.A., Craddock, K.J., Brandwein, J.M., Lipton, J.H., Minden, M.D., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., Gupta, V. (2013) Treatment outcomes following leukemic transformation in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 121(14), 2725-33.
- Kiladjian, J.J., Gardin, C., Renoux, M., Bruno, F., Bernard, J.F. (2003) Long-term outcomes of polycythemia vera patients treated with pipobroman as initial therapy. *The Hematology Journal*, 4, 198-207.

- Kiladjian, J.J., Cervantes, F., Leebeek, F.W., Marzac, C., Cassinat, B., Chevret, S., Cazals-Hatem, D., Plessier, A., Garcia-Pagan, J.C., Darwish Murad, S., Raffa, S., Janssen, H.L., Gardin, C., Cereja, S., Tonetti, C., Giraudier, S., Condat, B., Casadevall, N., Fenaux, P., Valla, D.C. (2008) The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*, 111(10), 4922-9.
- Kiladjian, J.J., Chevret, S., Dosquet, C., Chomienne, C., Rain, J.D. (2011) Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *Journal of Clinical Oncology*, 29(29), 3907-13.
- Kilpivaara, O., Mukherjee, S., Schram, A.M., Wadleigh, M., Mullally, A., Ebert, B.L., Bass, A., Marubayashi, S., Heguy, A., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Offit, K., Stone, R.M., Gilliland, D.G., Klein, R.J., Levine, R.L. (2009) A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics*, 41, 455-459.
- Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G.I., Bagienski, K., Milanesi, C., Casetti, I.C., Sant'Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C., Schischlik, F., Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schönegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto, C., Superti-Furga, G., Cazzola, M., Kralovics, R. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 369(25), 2379-90.
- Kligman, A.M., Greaves, M.W., Steinman, H. (1986) Water-induced itching without cutaneous signs. Aquagenic pruritus. *Archives of dermatology*, 122(2), 183-6.
- Koopmans, S.M., Bot, F.J., Lam, K.H., van Marion, A.M., de Raeve, H. & Hebeda, K.M. (2011) Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology*, 136, 618-624.
- Kralovics, R., Guan, Y., Prchal, J.T. (2002) Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Experimental Hematology*, 30, 229-236.
- Kralovics, R., Stockton, D.W., Prchal, J.T. (2003) Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood*, 102, 3793-3796.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, R.C. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England Journal of Medicine*, 352, 1779-1790.

- Lamy, T., Devillers, A., Bernard, M., Moisan, A., Grulois, I., Drenou, B., Amiot, L., Fauchet, R., Le Prise, P.Y. (1997) Inapparent polycythemia vera: an unrecognized diagnosis. *American Journal of Medicine*, 102(1), 14-20.
- Landolfi, R., Marchioli, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Tognoni, G., Patrono, C., Barbui, T.; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. (2004) Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *The New England Journal of Medicine*, 350, 114-24.
- Landolfi, R., Di Gennaro, L., Barbui, T., De Stefano, V., Finazzi, G., Marfisi, R., Tognoni, G., Marchioli, R.; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP). (2007) Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*, 109, 2446-2452.
- Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Møller, M.B. & Hasselbalch, H.C. (2007) The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis—impact on disease phenotype. *European Journal of Haematology*, 79, 508–515.
- Lemoine, F., Najman, A., Baillou, C., Stachowiak, J., Boffa, G., Aegerter, P., Douay, L., Laporte, J.P., Gorin, N.C., Duhamel, G. (1986) A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. *Blood*, 68, 996-1002.
- Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Fröhling, S., Döhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., Gilliland, D.G. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7, 387-397.
- Levine, R.L., Belisle, C., Wadleigh, M., Zahrieh, D., Lee, S., Chagnon, P., Gilliland, D.G., Busque, L. (2006) X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*, 107(10), 4139-41.
- Lindstedt, G. & Lundberg, P.A. (1998) Are current methods of measurement of erythropoietin (EPO) in human plasma or serum adequate for the diagnosis of polycythaemia vera and the assessment of EPO deficiency? *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 58, 441–458.

- Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupré, N., Skoda, R.C., Hermouet, S. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 108(6), 1865-7.
- Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., Beisel, C., Kralovics, R., Skoda, R.C. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123(14), 2220-8.
- Marchioli, R., Finazzi, G., Landolfi, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Patrono, C., Marilus, R., Villegas, A., Tognoni, G., Barbui, T. (2005) Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *Journal of Clinical Oncology*, 23(10), 2224-2232.
- Marchioli, R., Finazzi, G., Specchia, G., Cacciola, R., Cavazzina, R., Cilloni, D., De Stefano, V., Elli, E., Iurlo, A., Latagliata, R., Lunghi, F., Lunghi, M., Marfisi, R.M., Musto, P., Masciulli, A., Musolino, C., Cascavilla, N., Quarta, G., Randi, M.L., Rapezzi, D., Ruggeri, M., Rumi, E., Scortechini, A.R., Santini, S., Scarano, M., Siragusa, S., Spadea, A., Tieghi, A., Angelucci, E., Visani, G., Vannucchi, A.M., Barbui, T.; CYTO-PV Collaborative Group. (2012) Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *The New England Journal of Medicine*, 368, 22-33.
- Martínez-Avilés, L., Besses, C., Alvarez-Larrán, A., Cervantes, F., Hernández-Boluda, J.C., Bellosillo, B. (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica*, 92, 1717-1718.
- McMullin, M.F., Bareford, D., Campbell, P., Green, A.R., Harrison, C., Hunt, B., Oscier, D., Polkey, M.I., Reilly, J.T., Rosenthal, E., Ryan, K., Pearson, T.C., Wilkins, B.; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. (2005) Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *British Journal of Haematology*, 130(2), 174-95.
- McMullin, M.F., Reilly, J.T., Campbell, P., Bareford, D., Green, A.R., Harrison, C.N., Conneally, E.; National Cancer Research Institute, Myeloproliferative Disorder Subgroup, Ryan, K.; British Committee for Standards in Haematology. (2007) Amendment to the guideline for diagnosis and investigation of polycythaemia/erythrocytosis. *British Journal of Haematology*, 138(6), 821-2.
- McMullin, M.F. (2008) The classification and diagnosis of erythrocytosis. *International Journal of Laboratory Hematology*, 30(6), 447-59.
- McMullin, M.F. (2016) Investigation and Management of Erythrocytosis. *Current hematologic malignancy reports*, 11(5), 342-7.

- McNally, R.J., Rowland, D., Roman, E., Cartwright, R.A. (1997) Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematological Oncology*, 15(4), 173-89.
- Menon, K.V., Shah, V., Kamath, P.S. (2004) The Budd-Chiari syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 350, 578-585.
- Messinezy, M., Westwood, N.B., Woodcock, S.P., Strong, R.M. & Pearson, T.C. (1995) Low serum erythropoietin—a strong diagnostic criterion of primary polycythaemia even at normal haemoglobin levels. *Clinical and Laboratory Haematology*, 17, 217–220.
- Messinezy, M., Westwood, N.B., El-Hemaidi, I., Marsden, J.T., Sherwood, R.S., Pearson, T.C. (2002) Serum erythropoietin values in erythrocytosis and in primary thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*, 117(1),47-53.
- Meyer, S.C., Levine, R.L. (2014) Molecular pathways: molecular basis for sensitivity and resistance to JAK kinase inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 20(8), 2051-9.
- Michiels, J.J., Abels, J., Steketee, J., Van Vliet, H.H., Vuzevski, V.D. (1985) Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. *Annals of Internal Medicine*, 102, 466-471.
- Michiels, J.J., Juvonen, E. (1997) Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 23, 339-47.
- Michiels, J.J., Berneman, Z., Schroyens, W., Koudstaal, P.J., Lindemans, J., Neumann, H.A., van Vliet, H.H. (2006) Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: a distinct aspirin-responsive and coumadin-resistant arterial thrombophilia. *Platelets*, 17, 528-44.
- Modan, B., Kallner, H., Zemer, D., Yoran, C. (1971) A note on the increased risk of polycythemia vera in Jews. *Blood*, 37(2),172-176.
- Moliterno, A.R., Williams, D.M., Rogers, O., Isaacs, M.A., Spivak, J.L. (2008) Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Experimental Hematology*, 36(11), 1480-6.
- Mossuz, P., Girodon, F., Donnard, M., Latger-Cannard, V., Dobo, I., Boiret, N., Lecron, J.C., Binquet, C., Barro, C., Hermouet, S., Praloran, V. (2004) Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*, 89, 1194-1198.

- Muller, E.W., de Wolf, J.T., Egger, R., Wijermans, P.W., Huijgens, P.C., Halie, M.R., Vellenga, E. (1995) Long-term treatment with interferon-alpha 2b for severe pruritus in patients with polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 89, 313-8.
- Najean, Y., Dresch, C. & Rain, J.D. (1994) The very-long-term course of polycythaemia: a complement to the previously published data of the polycythaemia vera study group. *British Journal of Haematology*, 86, 233-235.
- Najean, Y., Rain, J-D. (1997a) A very long-term evolution of polycythemia vera: an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or 32P between 1969 and 1981. *Seminars in Hematology*, 34, 6-16.
- Najean, Y., Rain, J-D, for the French Polycythemia Study Group. (1997b) Treatment of polycythemia vera: use of P32 alone or in combination with maintenance therapy using hydroxyurea in 461 patients greater than 65 years of age. *Blood*, 89, 2319-2327.
- Najean, Y., Rain, J.D. for the French Polycythemia Study Group. (1997c) Treatment of polycythemia vera: the use of hydroxyurea and pipobroman in 292 patients under the age of 65 years. *Blood*, 90, 3370-3377.
- Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D., Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P., Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J., Harrison, C.N., Cross, N.C., Ron, D., Vannucchi, A.M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., Green, A.R. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England Journal of Medicine*, 369(25),2391-405.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K. (1998) Jak2 deficiency defines an essential development checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 93, 397-409.
- Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25, 85-109.
- Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jäger, R., Berg, T., Gisslinger, B., Pabinger, I., Gisslinger, H., Kralovics, R. (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics*, 41, 450-454.

- Ortmann, C.A., Kent, D.G., Nangalia, J., Silber, Y., Wedge, D.C., Grinfeld, J., Baxter, E.J., Massie, C.E., Papaemmanuil, E., Menon, S., Godfrey, A.L., Dimitropoulou, D., Guglielmelli, P., Bellosillo, B., Besses, C., Döhner, K., Harrison, C.N., Vassiliou, G.S., Vannucchi, A., Campbell, P.J., Green, A.R. (2015) Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *The New England Journal of Medicine*, 372, 601-612.
- Osca-Gelis, G., Puig-Vives, M., Saez, M., Gallardo, D., Lloveras, N., Marcos-Gragera, R. (2013) Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain. *Haematologica*, 98(8), e95-7.
- Osler, W. (1903) Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *The American Journal of the Medical Sciences*, 126, 187-201.
- Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., McClure, R.F., Litzow, M.R., Gilliland, D.G., Tefferi, A. (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*, 108(10), 3472-6.
- Pardanani, A., Lasho, T.L., Finke, C., Hanson, C.A., Tefferi, A. (2007) Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*, 21, 1960-3.
- Pardanani, A., Vannucchi, A.M., Passamonti, F., Cervantes, F., Barbui, T., Tefferi, A. (2011) JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. *Leukemia*, 25, 218-25.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G., Ihle J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 93(3), 385-95.
- Partanen, S., Juvonen, E., Ikkala, E., Ruutu, T. (1989) Spontaneous erythroid colony formation in the differential diagnosis of erythrocytosis. *European Journal of Haematology*, 42(4), 327-30.
- Passamonti, F., Brusamolino, E., Lazzarino, M., Baraté, C., Klersy, C., Orlandi, E., Canevari, A., Castelli, G., Merante, S., Bernasconi, C. (2000) Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: long-term results in 163 patients. *Haematologica*, 85, 1011-1018.
- Passamonti, F., Rumi, E., Pungolino, E., Malabarba, L., Bertazzoni, P., Valentini, M., Orlandi, E., Arcaini, L., Brusamolino, E., Pascutto, C., Cazzola, M., Morra, E., Lazzarino, M. (2004) Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *The American Journal of Medicine*, 117(10), 755-61.

- Passamonti, F., Rumi, E., Caramella, M., Elena, C., Arcaini, L., Boveri, E., Del, C.C., Pietra, D., Vanelli, L., Bernasconi, P., Pascutto, C., Cazzola, M., Morra, E. & Lazzarino, M. (2008) A dynamic prognostic model to predict survival in postpolycythemia vera myelofibrosis. *Blood*, 111, 3383–3387.
- Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Boveri, E., Arcaini, L., Roncoroni, E., Astori, C., Merli, M., Boggi, S., Pascutto, C., Lazzarino, M., Cazzola, M. (2010) 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*, 24(9), 1574-9.
- Passamonti, F., Elena, C., Schnittger, S., Skoda, R.C., Green, A.R., Girodon, F., Kiladjian, J.J., McMullin, M.F., Ruggeri, M., Besses, C., Vannucchi, A.M., Lippert, E., Gisslinger, H., Rumi, E., Lehmann, T., Ortmann, C.A., Pietra, D., Pascutto, C., Haferlach, T., Cazzola, M. (2011) Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Blood*, 117(10), 2813-6.
- Passamonti, F., Griesshammer, M., Palandri, F., Egyed, M., Benevolo, G., Devos, T., Callum, J., Vannucchi, A.M., Sivgin, S., Bensasson, C., Khan, M., Mounedji, N., Saydam, G. (2017) Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *The Lancet Oncology*, 18(1), 88-99.
- Pearson, T.C., Wetherley-Mein, G. (1978) Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet*, 1219-22.
- Pearson, T.C. (1991) Apparent polycythaemia. *Blood Reviews*, 5, 205-13.
- Pearson, T.C., Guthrie, D.L., Simpson, J., Chinn, S., Barosi, G., Ferrant, A., Lewis, S.M., Najean, Y. (1995) Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. *British Journal of Haematology*, 89, 748-56.
- Pearson, T.C. & Messinezy, M. (1996) The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. *Leukemia & Lymphoma*, 22 (Suppl 1), 87-93.
- Pearson, T.C., Messinezy, M., Westwood, N., Green, A.R., Bench, A.J., Green, A.R., Huntly, B.J., Nacheva, E.P., Barbui, T., Finazzi, G. (2000) A Polycythemia Vera Updated: Diagnosis, Pathobiology, and Treatment. *Hematology/ The education program of the American Society of Hematology*, 51-68.

- Pennathur-Das, R., Alpen, E., Vichinsky, E., Garcia, J., Lubin, B. (1984) Evidence for the presence of CFU-E with increased in vitro sensitivity to erythropoietin in sickle cell anemia. *Blood*, 63, 1168-71.
- Peterson, P. & Ellis, J. (1995) The bone marrow in polycythemia vera. In *Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders*. (ed. by L.R. Wasserman, P.D. Berk & N.I. Berlin), pp. 31– 53. W.B Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Pierre, R., Imbert, M., Thile, J., Vardiman, JW., Brunning, R.D, Flandrin, G. (2001) Polycythemia vera. In: *WHO classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (ed. by E.S Jaffe, N.L Harris, H. Stein, JW Vardiman), pp 61-73. IARC press, Lyon.
- Prchal, J.F., Axelrad, A.A. (1974) Letter: Bone marrow responses in polycythemia vera. *The New England Journal of Medicine*, 290, 1382.
- Randi, M.L., Barbone, E., Fabris, F., Varotto, L., Macri, C. & Girolami, A. (1994) Postpolycythemia myeloid metaplasia: experience with a large cohort of patients. *Journal of Medicine*, 25, 363–369.
- Ratnoff, W.D., Gress, R.E. (1980) The familial occurrence of polycythemia vera: report of a father and son, with consideration of the possible etiologic role of exposure to organic solvents, including tetrachloroethylene. *Blood*, 56(2), 233-6.
- Remacha, A.F., Montserrat, I., Santamaria, A., Oliver, A., Barcelo, M.J. & Parellada, M. (1997) Serum erythropoietin in the diagnosis of polycythemia vera. A follow-up study. *Haematologica*, 82, 406–410.
- Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., Pacilli, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Fanelli, T., Bosi, A. & Vannucchi, A. (2014) Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*, 123, 1552–1555.
- Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., Milanesi, C., Sant’antonio, E., Bellini, M., Fugazza, E., Renna, M.C., Boveri, E., Astori, C., Pascutto, C., Kralovics, R., Cazzola, M.; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. (2014) JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 123(10), 1544-51.
- Scott, L.M., Scott, M.A., Campbell, P.J., Green, A.R. (2006) Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*, 108(7), 2435-7.

- Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Warren, A.J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R. (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 356(5), 459-68.
- Sever, M., Quintás-Cardama, A., Pierce, S., Zhou, L., Kantarjian, H., Verstovsek, S. (2013) Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leukemia & Lymphoma*, 54(12), 2667-70.
- Silverstein, M.N. (1974) Postpolycythemia myeloid metaplasia. *Archives of Internal Medicine*, 134, 113-117.
- Silverstein, M.N. (1976) The evolution into and the treatment of late stage polycythemia vera. *Seminars in Hematology*, 13, 79-84. Spivak, J.L. (2002) Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. *Blood*, 100, 4272-4290.
- Smalberg, J.H., Arends, L.R., Valla, D.R., Kiladjian, J.J., Janssen, H.L., Leebeek, F.W. (2012) Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*, 120, 4921-4928.
- Spivak, J.L. (2002) Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*, 100, 4272-4290.
- Spivak, J.L. and Silver, R.T. (2008) The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood*, 112, 231-239.
- Steensma, D.P. (2006) JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8, 397-411.
- Stein, B.L., Williams, D.M., Wang, N.Y., Rogers, O., Isaacs, M.A., Pemmaraju, N., Spivak, J.K. & Moliterno, A.R. (2010) Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 95, 1090-1097.
- Stein, B.L., Williams, D.M., Rogers, O., Isaacs, M.A., Spivak, J.L., Moliterno, A.R. (2011) Disease burden at the progenitor level is a feature of primary myelofibrosis: a multi-variable analysis of 164 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasm patients. *Experimental Hematology*, 39(1), 95-101.
- Stein, B.L., Saraf, S., Sobol, U., Halpern, A., Shammo, J., Rondelli, D., Michaelis, L., Odenike, O., Rademaker, A., Zakarija, A., McMahan, B., Spivak, J.L., Moliterno, A.R. (2013) Age-related differences in disease characteristics and clinical outcomes in polycythemia vera. *Leukemia & Lymphoma*, 54(9), 1989-95.

- Tam, C.S., Nussenzveig, R.M., Popat, U., Bueso-Ramos, C.E., Thomas, D.A., Cortes, J.A., Champlin, R.E., Ciurea, S.E., Manshour, T., Pierce, S.M., Kantarjian, H.M., Verstovsek, S. (2008) The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 112(5), 1628-37.
- Tatarsky, I., Sharon, R. (1997) Management of polycythemia vera with hydroxyurea. *Seminars in Hematology*, 34, 24-28.
- Tefferi, A., Fonseca, R. (2002) Selective serotonin reuptake inhibitors are effective in the treatment of polycythemia vera-associated pruritus. *Blood*, 99, 2627.
- Tefferi, A., Lasho, T.L., Schwager, S.M., Strand, J.S., Elliott, M., Mesa, R., Li, C.Y., Wadleigh, M., Lee, S.J., Gilliland, D.G. (2006) The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous *JAK2V617F* in polycythemia vera. *Cancer*, 106, 631-635.
- Tefferi, A., Thiele, J., Orazi, A., Kvasnicka, H.M., Barbui, T., Hanson, C.A., Barosi, G., Verstovsek, S., Birgegard, G., Mesa, R., Reilly, J.T., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Cervantes, F., Finazzi, G., Hoffman, R., Gilliland, D.G., Bloomfield, C.D. & Vardiman, J.W. (2007) Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, 110, 1092– 1097.
- Tefferi, A. (2010) Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* and *IKZF1*. *Leukemia*. 24(6), 1128-38.
- Tefferi, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Vaidya, R., Cazzola, M., Rambaldi, A., Gisslinger, B., Pieri, L., Ruggeri, M., Bertozzi, I., Sulai, N.H., Casetti, I., Carobbio, A., Jeryczynski, G., Larson, D.R., Müllauer, L., Pardanani, A., Thiele, J., Passamonti, F., Barbui, T. (2013) Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 27(9), 1874-1881.
- Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D.R., Finke, C., Wassie, E.A., Pieri, L., Gangat, N., Fjerza, R., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Rambaldi, A., Finazzi, G., Thiele, J., Barbui, T., Pardanani, A., Vannucchi, A.M. (2014) Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 124(16), 2507-13.
- Teman, C.J., Wilson, A.R., Perkins, S.L., Hickman, K., Prchal, J.T. & Salama, M.E. (2010) Quantification of fibrosis and osteosclerosis in myeloproliferative neoplasms: a computer-assisted image study. *Leukemia Research*, 34, 871–876.

- Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Fischer, R. (1999) Histochemistry and morphometry on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders - aids to diagnosis and classification. *Annals of hematology*, 78, 495-506.
- Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Vardiman, J. (2006) Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl. *Best Practice and Research. Clinical Haematology*, 19, 413-37.
- Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Orazi, A., Tefferi, A., Birgegard, G. (2008) Polycythemia vera. In: WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed. by S. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele & J.W. Vardiman), pp.40-43. IARC press, Lyon.
- Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Müllauer, L., Buxhofer-Ausch, V., Gisslinger, B. & Gisslinger, H. (2011) Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*, 117, 5710–5718.
- Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., Skoda, R.C. (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, 111(8),3931-40.
- Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S.N., Bernard, O.A. (2011) New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 118, 1723-1735.
- Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Longo, G., Pancrazzi, A., Ponziani, V., Bogani, C., Ferrini, P.R., Rambaldi, A., Guerini, V., Bosi, A., Barbui, T., MPD Research Consortium. (2007a) Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on *JAK2*(V617F) allele burden. *Leukemia*, 21, 1952-1959.
- Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Rambaldi, A., Barosi, G., Marchioli, R., Marfisi, R.M., Finazzi, G., Guerini, V., Fabris, F., Randi, M.L., De Stefano, V., Caberlon, S., Tafuri, A., Ruggeri, M., Specchia, G., Liso, V., Rossi, E., Pogliani, E., Gugliotta, L., Bosi, A., Barbui, T. (2007b) Clinical profile of homozygous *JAK2* 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*, 110, 840-846.
- Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pardanani, A., Tefferi, A. (2008a) Clinical correlates of *JAK2*V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*, 22,1299-1307.
- Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Guerini, V., Barosi, G., Ruggeri, M., Specchia, G., Lo-Coco, F., Delaini, F., Villani, L., Finotto, S., Ammatuna, E., Alterini, R., Carrai, V., Capaccioli, G., Di Lollo, S., Liso, V., Rambaldi, A., Bosi, A. & Barbui, T. (2008b) Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*, 112, 844–847.

- Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., He, S., Jones, M.M., Garrett, W., Li, J., Pirron, U., Habr, D., Verstovsek, S. (2015) Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *The New England Journal of Medicine*, 372(5), 426-35.
- Vaquez, H. Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistente (On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis). *Compt rend Soc de biol and suppl note, Bull et mem Soc med d'hop de Paris*, 3 ser 1895; 12, 60 1892; 4: 384-388.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A. & Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114, 937-951.
- Weinfeld, A., Swolin, B., Westin, J. (1994) Acute leukaemia after hydroxyurea therapy in polycythaemia vera and allied disorders: prospective study of efficacy and leukaemogenicity with therapeutic implications. *European Journal of Haematology*, 52, 134-139.
- Westwood, N.B., Pearson, T.C. (1996) Diagnostic applications of haemopoietic progenitor culture techniques in polycythaemias and thrombocythaemias. *Leukemia and Lymphoma*, 22(Suppl 1), 95-103.
- Wilkins, B.S., Erber, W.N., Bareford, D., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Paul, B., Harrison, C.N., Green, A.R., Campbell, P.J. (2008) Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*, 111, 60-70.
- Woessner, S., Florensa, L., Pérez-Vila M.E., Solé, F., Espinet, B. Salido, M. (2006). Síndromes mieloproliferativos crónicos, mastocitosis. In: *La citología óptica en el diagnóstico hematológico* (ed. By Acción médica S.A. y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia), pp. 488-98, Madrid.
- Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., Zhao, Z.J. (2005) Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *The Journal of biological chemistry*, 280, 22788-22792.

