

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Medicina

Programa de Doctorat: Medicina Interna

**Associació de l'estat mutacional de *JAK2* i les anomalies
citogenètiques en les neoplàsies mieloproliferatives cròniques
Filadèlfia negatives: Correlació amb les dades clíniques i
analítiques**

Treball de recerca presentat per

Marisol Xandri Puig

Director: Prof. Evarist Feliu Frasnado

Co-directora: Dra. Fuensanta Millá Santos

Convocatòria: setembre 2012

RESUM

Les NMP són trastorns clonals de les cèl·lules mare hematopoètiques caracteritzades per la proliferació d'una o més línies mieloides. A les NMP cròniques Filadèlfia negatives (TE, PV i MFP) no hi ha cap marcador específic pel seu diagnòstic, tot i la importància de l'estudi de la mutació *JAK2V617F* i el cariotip.

El nostre objectiu és trobar una correlació entre l'estat mutacional de *JAK2V617F*, les alteracions citogenètiques, algunes dades clíniques i alguns paràmetres de laboratori i veure l'impacte que poden tenir sobre la progressió de la malaltia i el pronòstic.

El nostre estudi inclou 526 pacients diagnosticats de NMPc Filadèlfia negatives (348 TE, 135 PV i 43 MFP). Vam recollir les dades clíniques, paràmetres de laboratori, citogenètica i l'estudi molecular del gen *JAK2V617F*.

L'estudi va concloure que la freqüència d'alteracions citogenètiques trobades en els pacients amb *JAK2* mutat era similar al grup de *JAK2* salvatge. El cariotip i l'estat mutacional de *JAK2* eren independents. En els pacients en progressió tampoc hi havia una correlació però sí que la majoria de pacients en progressió i cariotip alterat eren *JAK2* mutat.

L'esplenomegalia i els símptomes constitucionals eren independents de la mutació *JAK2V617F* però sí que hi havia correlació amb les complicacions. El grup de pacients *JAK2* + tenien més probabilitat de presentar complicacions en el curs de la malaltia.

També vam trobar correlació entre el grup de pacients *JAK2* + i l'augment de la xifra de leucòcits i d'hemoglobina en la TE i amb la xifra de plaquetes en la PV.

INDEX

RESUM

Agraïments.....	4
1.Glossari d'abreviatures	5
2. Introducció	7
3. Hipòtesi	21
4. Objectius	21
5. Material i mètodes.....	22
5.1 Número de pacients	22
5.2. Dades clíniques i paràmetres analítics.....	22
5.3. Estudis citogenètics	22
5.4. Estudis de FISH	24
5.5. Estudis moleculars	26
5.5.1 Reacció en cadena de la polimerasa pel gen de fusió <i>BCR/ABL</i>	26
5.5.2. Descripció de la tècnica de discriminació al·lèlica com a eina bàsica per la detecció de la mutació pel gen <i>JAK2V617F</i>	27
5.6. Anàlisis estadístics	29
6. Resultats	30
6.1. Correlació entre les alteracions citogenètiques i la progressió de la malaltia	31
6.2. Correlació entre les alteracions citogenètiques i <i>JAK2</i>	31
6.3. Correlació entre les dades clíniques i <i>JAK2</i>	31
6.4. Correlació entre els paràmetres de laboratori i <i>JAK2</i>	32
6.5. Correlació entre la Supervivència Global i <i>JAK2</i>	34
6.6. Correlació entre la Supervivència Lliure de progressió i <i>JAK2</i>	37
7. Discussió.....	40
8. Conclusions	42
9. Bibliografia	44

Agraïments

Als directors del treball, per les seves indicacions, correccions i empenta.

Als companys de Citogenètica i de Biologia Molecular pel seu ajut i suport en aquest projecte. En especial a la Dra. Isabel Granada i a la Dra. Lurdes Zamora pels seus ensenyaments.

A la Dra. Olga Garcia per la seva ajuda en la valoració estadística.

Al suport de l'Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreres.

1. Glossari d'abreviatures

ADN: àcid desoxiribunocleic

ADNc: àcid desoxiribonucleic complementari

aLMC: leucèmia mieloide crònica atípica

ARN: àcid ribunocleic

ARSA-T: anèmia refractària amb sideroblasts en anell i trombocitosi

BCR/ABL: breakpoint cluster region/Abelson

CO₂: diòxid de carboni

D: dona

del: deleció

der: derivatiu

EPO: eritropoetina

F, Phe: fenilalanina

FAG: fosfatases alcalines granulocítiques

FISH: *fluorescence in situ hybridization*, hibridació in situ fluorescent

g/dL: grams/decilitre

G: guanina

H: home

h: hora

Hb: hemoglobina

HEM: hematopoesi extramedul.lar

HES: Hospital Esperit Sant

HMB: Hospital Municipal de Badalona

Hto: hematòcrit

ICO: Institut Català d'Oncologia

ISCN: International System Human Cytogenetic Nomenclature

KCl: clorur potàssic

Kg: kilogram

LA-B: leucèmia limfoblàstica aguda B

LEC: leucèmia eosinofílica crònica

LMA: leucèmia mieloblàstica aguda

LMC: leucèmia mieloide crònica

LMMC: leucèmia mielomonocítica crònica

LMMj: leucèmia mielomonocítica juvenil

LNC: leucèmia neutrofílica crònica
M: molar
MFP: mielofibrosi primària
ml: mil·lilitre
MM: metaplàsia mieloide
mm: mil·límetres
MO: medul·la òssia
nM: nanomols
NMP: neoplàsies mieloproliferatives cròniques
°C: graus centígrads
OMS: Organització Mundial de la Salut
pb: parells de bases
PCR: *polymerase chain reaction*
Ph: *Philadelphia*, Filadèlfia
Plq: plaquetes
PTK: proteïna *tyrosine kinase*
PV: policitèmia vera
PVSG: *Polycythemia Vera Study Group*, Grup d'Estudi de la Policitèmia Vera
rpm: revolucions per minut
RPMI: Roswell Park Memorial Institut, medi de cultiu
RT: retrotranscripció
SG: supervivència global
SLP: Supervivència lliure de progressió
SLP: síndromes limfoproliferatius
SMD: síndromes mielodisplàsiques
SSC: Solució d'hibridació aquosa
T: timina
t: translocació
T^a: temperatura
TE: trombocitèmia essencial
V, Val: valina
WT: wild type, salvatge
λ: lambda
μl: microlitre

2. Introducció

Neoplàsies mieloproliferatives cròniques

Les Neoplàsies Mieloproliferatives (NMP) són trastorns clonals de les cèl·lules mare hematopoètiques (stem cell) caracteritzades per la proliferació d'una o més línies mieloides. La seva incidència és de 6-10 casos per 100.000 habitants i any. Tot i que es presenten principalment en adults entre la cinquantena-setantena d'edat, també les podem trobar en nens, sobre tot la leucèmia mieloide crònica (LMC) i la trombocitèmia essencial (TE)(1).

Les primeres fases d'aquestes neoplàsies es caracteritzen per presentar una medul·la òssia hiperplàstica, amb una hematopoesi eficaç que dona lloc a un augment del nombre de cèl·lules madures d'una o més línies mieloides segons l'entitat que es tracti i tenen tendència a desenvolupar fibrosi medul·lar(2-4). Freqüentment presenten esplenomegàlia i hepatomegàlia. Totes les NMP poden presentar progressió clonal però és molt variable segons l'entitat.

A l'última revisió de l'Organització Mundial de la Salut 2008 (OMS)(1) s'inclouen en aquesta categoria els següents subgrups:

- Leucèmia mieloide crònica, *BCR-ABL* positiva (LMC)
- Leucèmia neutrofílica crònica (LNC)
- Policitemia Vera (PV)
- Mielofibrosi Primària (MFP)
- Trombocitèmia Essencial (TE)
- Leucèmia Eosinofílica Crònica (LEC)
- Mastocitosis
- Neoplàsies mieloproliferatives inclassificables

En aquest estudi només tractarem les NMP clàssiques Ph negatives (TE,PV,MFP) excloent la resta.

Trombocitèmia Essencial

Es una neoplàsia mieloproliferativa crònica que afecta especialment a la línia megacariocítica, caracteritzada per un increment persistent de la xifra de plaquetes ($>450 \times 10^9/L$) en SP, hiperplàsia megacariocítica en MO amb megacariòcits grans i madurs i clínicament per episodis de trombotosi i/o hemorràgia. Fins el moment no hi ha cap marcador biològic o genètic específic, per la qual cosa s'han de descartar altres causes de

trombocitosi, com altres NMP (LMC, PV, MFP), processos inflamatoris i trastorns infecciosos, hemorràgies i altres neoplàsies hematològiques o no hematològiques, així com la presència del gen de fusió *BCR/ABL1*(1). La seva incidència és desconeguda. A l'any 1986 amb algunes modificacions a l'any 1997 (Taula 1), el grup d'estudi de la policitèmia vera (PVSG) va proposar unes directrius pel seu diagnòstic(2). Basant-nos en aquests criteris la seva incidència seria de 0,6-2,5 per cada 100.000 persones/any, sent més freqüent als 50-60 anys sense predomini de cap sexe tot i que hi ha un segon pic que afecta més a les dones al voltant dels 30 anys. En nens és molt infreqüent i s'ha de distingir de la trombocitosis hereditària.

La seva etiologia és també desconeguda.

L'afectació és principalment en sang i medul·la òssia. A la melsa no es detecten trets d'hematopoesi extramedul·lar, però si que és un reservori de plaquetes.

Més de la mitat dels pacients són asimptomàtics i es poden detectar per un recompte elevat de plaquetes en sang, la resta es diagnostiquen per alguna manifestació de trastorns vasculars. Si ens basem en els criteris del PVSG (Taula 1), el 50% dels pacients presenten esplenomegàlia i un 15-20% hepatomegàlia; però si apliquem els criteris de la OMS (taula 2) només una minoria tenen esplenomegàlia.

Posteriorment a l'última modificació del PVSG, un grup d'investigadors internacionals van formular uns nous criteris incorporant alguna modificació com ara baixar el llindar del nombre de plaquetes de $600 \times 10^9/L$ a $>450 \times 10^9/L$ i la OMS es va acollir a aquestes recomanacions que permetien diagnosticar més casos de TE. Van redactar els nous criteris pel diagnòstic de la TE (Taula 2).

Taula 1: Criteris diagnòstics de la TE segons el PVSG

-
1. Recompte de plaquetes $>600 \times 10^9/L$
 2. Hematòcrit $<0,40L/L$ o massa eritrocitària normal
H $<36mL/Kg$, D $<32mL/Kg$
 3. Ferro medul·lar present o ferritina sèrica normal o VCM normal
 4. Absència del cromosoma Ph' o del reordenament *BCR/ABL*
 5. Fibrosi col·làgena de la MO absent o $< 1/3$ de l'àrea de la biòpsia, sense esplenomegàlia ni síndrome leucoeritoblàstica acompanyant.
 6. Absència d'evidència morfològica o citogenètica de SMD
 7. Absència de causa coneguda de trombocitosi reactiva.
-

Taula 2: Criteris diagnòstics de la TE segons l'OMS: El diagnòstic requereix complir amb els quatre criteris.

1. Recompte persistent de plaquetes $>450 \times 10^9/L$
2. Biòpsia de medul·la òssia amb proliferació principalment de la línia megacariocítica amb un augment del nombre de megacariòcits madurs i de mida gran. Sense desviació significativa a l'esquerra
3. No complir amb criteris de l'OMS per la policitemia vera, per la mielofibrosi primària, per a la LMC *BCR/ABL 1+* o per a la SMD o per altres neoplàsies mieloides
4. Demostració de *JAK2V617F* o un altre marcador clonal, o en absència de *JAK2V617F*, que no hi hagi evidència de trombocitosi reactiva.

Els trets més característics en SP són l'elevat nombre de plaquetes amb anisocitosi, que van des de plaquetes grans amb formes atípiques a gegants, poden presentar pseudòpodes, agranulars o hipogranulars, a vegades es poden trobar nuclis de megacariòcits circulants o fragments de citoplasmes. Tot i que hi ha pacients que gairebé no presenten alteracions morfològiques plaquetàries. Normalment els leucòcits són normals o poden presentar una lleugera leucocitosi, basofília absent o mínima ($<3\%$) i glòbuls vermells normals a excepció de quan hi ha hemorràgies recurrents(1,5).

La MO(1,5) normal o moderadament hipercel·lular amb intensa hiperplàsia megacariocítica, on els megacariòcits són de mida gran o gegant, aspecte madur i nucli hiperlobulat i es disposen dispersos per la MO o en petits acúmul (*clusters*); però no són tant aberrants com els que trobem en la MFP. També s'observa freqüentment fenòmens d'emperipoiesi però no és específic de la TE. Cal tenir en compte que alguns pacients amb LMC inicialment es poden presentar amb trombocitosi i sense leucocitosi imitant la TE; per tant, tal i com hem dit anteriorment és imprescindible descartar el gen de fusió *BCR/ABL 1*.

No s'han descrit anomalies fenotípiques associades.

No hi ha anomalies moleculars ni citogenètiques específiques per la TE. Aproximadament el 50% dels pacients tenen la mutació *JAK2V617F* o una altra mutació similar però no són específiques. La *MPLW515K/L* s'ha trobat en el 1% dels casos.

En quant a la citogenètica només el 5-10% dels pacients amb TE presenten un cariotip alterat al moment del diagnòstic; les anomalies més freqüents són la +8, alteracions de 9q i del(20q). En ocasions s'ha

trobat del(5q) i en aquests casos s'ha de comprovar el diagnòstic per tal de no confondre'l amb un SMD associat a la del(5q).

En quant al seu pronòstic, la TE és un trastorn indolent que en ocasions pot presentar episodis tromboembòlics o hemorràgics on perilla la vida del pacient. Molt infreqüentment pot desenvolupar fibrosi de la MO amb metaplàsia mieloide. La seva transformació a LMA o SMD és <5% i, si es dona, sol estar relacionada amb el tractament amb citotòxics. La mitjana de supervivència és de 10-15 anys. Es pot considerar que l'esperança de vida d'aquests pacients és pràcticament normal. Segons un estudi publicat al 1997, d'un total de 2000 pacients amb una mortalitat del 9,6% les causes eren: 3,1% per trombosi, 0,3% per complicacions hemorràgiques, un 1,1% per la transformació a LMA i la resta per neoplàsies sòlides i causes desconegudes.

Policitèmia Vera

És una neoplàsia mieloproliferativa crònica d'origen clonal que afecta principalment els precursors eritroides i que es caracteritza per un increment de la producció d'eritròcits. El 90-95% dels pacients són portadors de la mutació *JAK2V617F* o d'altres mutacions fora de l'exò 14 (ex: exò 12). Això fa que no només s'afecti la proliferació de glòbuls vermells, sinó també afecta als granulòcits i els megacariòcits originant una panmielosi.

En la PV, segons la classificació de l'OMS distingim tres fases:

1. Fase pre-policitèmica: eritrocitosi lleu
2. Fase policitèmica: increment de la massa eritrocitària (citèmia)
3. Fase post-policitèmica: amb citopènies, inclòs anèmia, hematopoesi ineficaç, fibrosi medul·lar, hematopoesi extramedul·lar i hiperesplenisme

Presenta una baixa incidència d'evolució cap a SMD i/o LMA. Queden exclosos d'aquesta categoria les eritrocitosis secundàries, policitèmia hereditària i altres NMP. Pel seu diagnòstic s'han d'integrar els resultats del laboratori, la clínica i les característiques histològiques (Taula 3)

Taula 3: Els criteris diagnòstics segons la OMS són:

•**Criteris majors:**

1. Hb en Homes >18,5g/dL i en dones >16,5g/dL o Hb o Hto >99 percentil en funció del valor de referència per edat, sexe i altitud de residència o evidència d'augment de la citèmia (>25% del valor calculat)
2. Presència de la mutació *JAK2V617F* o altre mutació similar com a l'exó 12 del *JAK2*

•**Criteris menors:**

1. Biòpsia de moll d'os hiperplàstica per l'edat, amb panmielosi i una proliferació evident eritroide, granulocítica i megacariocítica
2. Nivells d'eritropoetina sèrica per sota dels valors normals
3. Formació de colònies eritroides endògenes

La incidència anual de la PV augmenta amb l'edat i varia entre 0,7-2,6 casos per 100.000 habitants a Europa i Nord-Amèrica, té un lleuger predomini en homes 2,1-1 i la mitja d'edat és 60 anys.

L'etiologia és de causa desconeguda, hi ha algun cas descrit de predisposició genètica familiar. En algun cas s'ha considerat com causa possible l'exposició ocupacional a tòxics o radiacions ionitzants, però no hi ha res conclouent.

L'afectació és principalment en sang i medul·la òssia, però també poden estar afectats la melsa i el fetge que són molt importants en etapes posteriors quan es dona una eritropoesi extramedul·lar. Tanmateix poden haver altres òrgans afectats com a resultat de les conseqüències vasculars per l'increment de la massa eritrocitària.

No s'han descrit anomalies fenotípiques associades.

L'alteració genètica més freqüent és la mutació de *JAK2V617F* que es troba en el 90-95% dels casos de PV, tot i que no és específica d'aquesta malaltia. Una altre mutació amb una funció similar que es troba en els pacients amb PV és la de l'exó 12 de *JAK2*. Però de moment no hi ha cap alteració genètica específica de la PV.

Al moment del diagnòstic es troben anomalies citogenètiques en un 20% dels pacients i les més freqüents són +8, +9, del(20q), del(13q) i del(9p). En moltes ocasions la +8 i +9 es troben associades. Són cromosoma Filadèlfia o *BCR-ABL1* negatiu. Les anomalies cromosòmiques augmenten amb la progressió de la malaltia sent d'un 80-90% en les

MF post-PV i podent arribar a ser pràcticament del 100% en els casos que evolucionen a SMD o LMA.

El pronòstic amb els tractaments actuals és bo, tenint una supervivència superior als 10 anys. La incidència de transformació a SMD y LMA és només d'un 2-3% en pacients no tractats amb citotòxics i augmenta a un 10% després d'haver rebut alguns tipus de quimioteràpia.

Mielofibrosi primària

És una neoplàsia mieloproliferativa crònica d'origen clonal caracteritzada principalment per la proliferació de megacariòcits i granulòcits en MO i en el desenvolupament de la malaltia s'associa a la presència de teixit connectiu fibrós i hematopoesi extramedul.lar (HEM). La seva evolució va des de una fase prefibròtica amb una MO hipercel.lular amb escassa o sense fibrosi reticulínica a una fase fibròtica amb una marcada fibrosi reticulina o col.làgena i freqüentment osteosclerosi(5) (Taula 4).

Taula 4: Els criteris diagnòstics segons la OMS, dels que s'han de trobar els 3 majors i almenys 2 dels criteris menors són:

• **criteris majors**

1. Presència de la proliferació de megacariòcits atípics, en general acompanyada per fibrosi de reticulina i/o de col·làgena ,

o
en absència de fibrosi reticulina significativa, els canvis en els megacariòcits han d'estar acompanyats per un augment de la cel·lularitat de la MO caracteritzada per la proliferació granulocítica i sovint la disminució de l'eritropoesi (es a dir: fase cel·lular prefibròtica de la malaltia).
2. No complir amb els criteris de l'OMS per a la policitèmia vera, per la LMC *BCR-ABL1+*, per la síndrome mielodisplàsica, o per altres neoplàsies mieloides
3. La demostració de *JAK2V617F* o un altre marcador (Ex: *MPLW515K/L*),

o
en absència d'un marcador clonal, no ha d'haver evidència de que la fibrosi de la MO o altres canvis siguin secundaris a un altre tipus de neoplàsia (tricoleucèmia, limfoma, metàstasis) o a infecció, a trastorns autoimmunes o inflamatoris o tòxics.

• **criteris menors**

1. Leucoeritroblastosi
 2. Increment dels nivells en sèrum de lactat deshidrogenasa (LDH)
 3. Anèmia
 4. Esplenomegàlia
-

Segons la classificació de la OMS distingim 3 etapes:

1. Etapa prefibròtica o primerenca: Només es detecte en un 30-40% dels pacients. MO hipercel·lular, on destaquen uns megacariòcits molt atípics, amb fibrosi reticulínica mínima o absent.
2. Etapa fibròtica: en aquesta etapa es diagnostiquen la majoria dels pacients. La MO pot ser encara focalment hipercel·lular i més freqüentment normocel·lular o hipocel·lular, megacariòcits atípics formant grups i amb fibrosi reticulina o col·làgena evident. En els pacients amb diagnòstic previ de MFP i un 10-19% de blasts en

SP o MO això indica que es troben en una fase accelerada de la malaltia, mentre que si els blasts són >20% es considera una transformació a leucèmia aguda. Hi ha pacients que es diagnostiquen en aquestes fases accelerades o agudes.

3. Hematopoesi extramedul·lar (HEM): el lloc més freqüent on es dona és la melsa, seguit del fetge. A la melsa es produeix una expansió de la polpa vermella per eritròcits, granulòcits i megacariòcits, aquests últims són els més visibles.

La incidència de la fase fibròtica evident es de 0,5-1,5 per cada 100.000 habitants/any. És més freqüent entre els seixanta – setanta anys i els nens raras vegades poden estar afectes. La proporció per sexes és similar.

La seva etiologia no està del tot clara, hi ha casos relacionats amb exposició a radiacions ionitzants o benzè, casos d'aparició en joves amb una condició hereditària autosòmica recessiva i altres casos on sembla que podrien tenir una predisposició familiar.

La sang i la mèdul·la òssia sempre estan afectades mentre que a les últimes etapes de la malaltia, amb la presència de HEM o metaplàsia mieloide també està involucrada la melsa. Al inici de la malaltia hi ha un lleuger augment de cèl·lules CD34+ en MO, però en etapes posteriors també augmenten en sang (fet que no es dona ni en la PV no fibròtica, ni en la TE) i hi ha la teoria que aquesta HEM és conseqüència de la capacitat de la melsa per segrestar les cèl·lules CD34+ circulants. La HEM també es dona en el fetge i altres zones.

No s'han descrit anomalies fenotípiques associades.

No s'han identificat alteracions genètiques específiques per aquesta malaltia. Aproximadament el 50% de pacients amb MFP presenten la mutació *JAK2V617F* i un 5% la mutació de *MPLW515K/L*(1,6-8).

En quant a les anomalies citogenètiques es donen en un 30% dels pacients al moment del diagnòstic. S'ha de descartar el cromosoma Ph i el gen de fusió *BCR/ABL*. Alteracions com la del(13)(q12q22) o der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3) són molt suggestives de MFP però no específiques. Les alteracions recurrents més freqüents són: del(20q), trisomies parcials de 1q i +8 i/o +9.

A vegades es pot trobar delecions de 5q i 7q però aquestes poden estar relacionades als tractaments citotòxics.

La supervivència en aquests pacients varia molt segons la fase en que s'han diagnosticat amb un temps de supervivència de 3 a 7 anys en fase fibròtica mentre que en fase prefibròtica es pot allargar a 10 - 15 anys.

Els factors que poden afectar de manera desfavorable(9) són: l'edat >70 anys, Hb <10g/dl, plaquetes <100x10⁶/L i un cariotip alterat. La causa de mort s'associa a un fracàs de la mèdulla, esdeveniments tromboembòlics, hipertensió portal i problemes cardíacs. L'evolució a LMA es produeix entre un 5-30% dels casos, tot i que en algun cas podria estar relacionada amb el tractament.

Citogenètica i alteracions moleculars en les NMP Ph negatives

Els **estudis citogenètics** es van començar a les dècades dels seixanta-setanta. En aquell moment s'utilitzaven tècniques de tinció uniforme que no permetien definir amb seguretat alteracions citogenètiques. Posteriorment es van utilitzar les tècniques actuals que ens permeten obtenir un patró de bandes típic per cada cromosoma (bandes G) amb les que si es pot demostrar la presència d'alteracions cromosòmiques (numèriques i/o estructurals)(2).

En aquest grup de NMP Ph negatives, en què la seva condició inicial és descartar el cromosoma *Philadelphia* i el gen de fusió *BCR/ABL*(1,10), no trobem alteracions citogenètiques en la majoria de casos i quan aquestes estan presents no són específiques. La freqüència d'alteracions oscil·la entre un 5-10% en la TE, 20% en la PV i més d'un 30% en la MI (Taula 5). Donat que la FISH no augmenta el percentatge d'alteracions citogenètiques no és una tècnica que s'utilitzi rutinàriament al diagnòstic, excepte per descartar el reordenament *BCR/ABL* quan no s'hagi confirmat la seva absència per tècniques de biologia molecular(11).

Taula 5: Alteracions citogenètiques més freqüents en la TE, PV i MFP

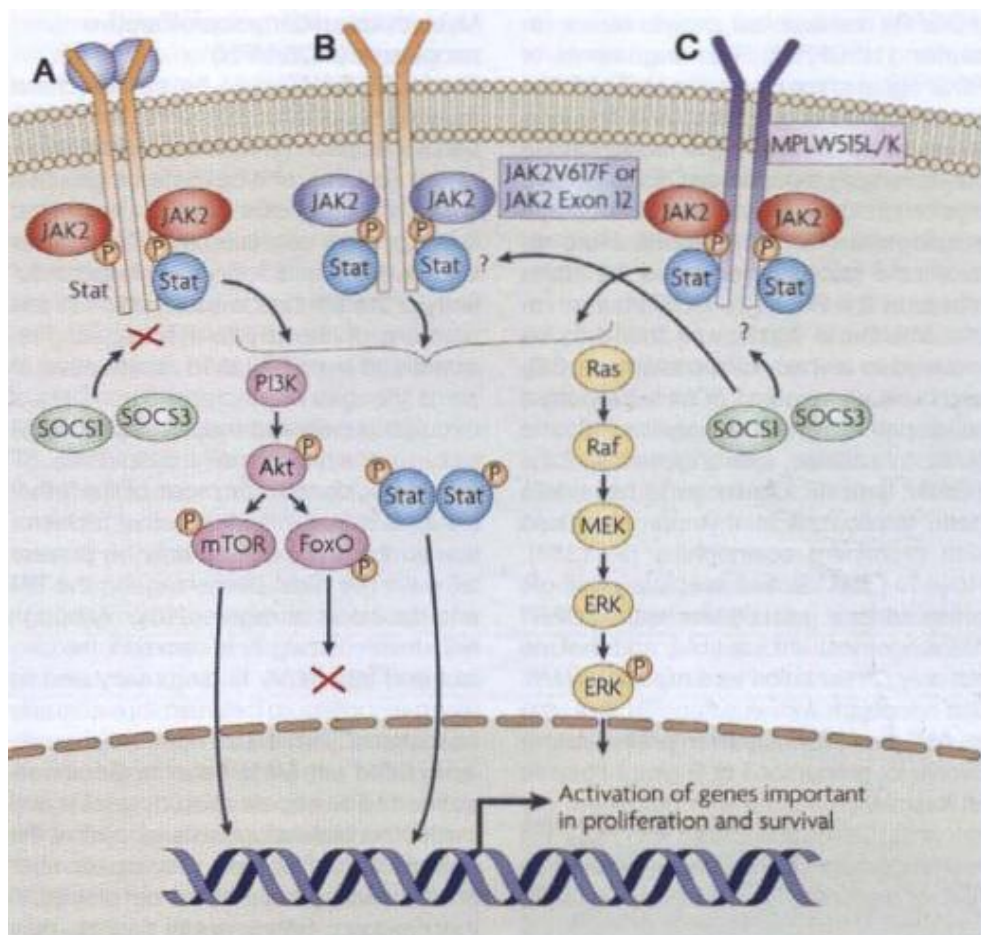
Alteracions citogenètiques més freqüents	
TE	<p>Entre un 5-10% dels casos presenten alteracions citogenètiques al moment del diagnòstic i normalment augmenten durant la transformació a LMA.</p> <ul style="list-style-type: none"> • +9 la més freqüent, en un 10% dels cariotips alterats. • +8 (1-2%) • Alteracions de 9q • del(20)(q11.2q13.3) 0,2-0,3%
PV	<p>En el diagnòstic es troben alteracions en aproximadament el 20% dels pacients, pot augmentar com més avançada és la fase de la malaltia. Per ordre decreixent de freqüència són:</p> <ul style="list-style-type: none"> • del(20)(q11.2q13.3) 20% • dup(1)(q23q32) 10% • +8 (16%) • +9 (16%) (+8 i +9 poden formar part del mateix clon) • del(13)(q12q22). Es detecta sobretot en situacions de mielofibrosi • del/- 5 i del/-7 es poden trobar normalment en la transformació leucèmica <p>La presència d'anomalies al diagnòstic no necessàriament li dona pitjor pronòstic, però l'evolució clonal durant la evolució de la malaltia s'associa a un major risc de transformació leucèmica i en els casos transformats es detecten alteracions fins en un 85% dels casos.</p>
MFP	<p>Entre un 30-75% dels casos presenten alteracions citogenètiques al moment del diagnòstic.</p> <p>No hi ha alteracions específiques però hi trobem 2 molt suggestives:</p> <ul style="list-style-type: none"> • del(13)(q12q22). Poc freqüent però de mal pronòstic. • der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3) <p>Altres anomalies recurrents són:</p> <ul style="list-style-type: none"> • del(20q) 65% dels cariotips alterats • trisomies parcials de 1q • +8 • +9 • del(5q)/del(7q) relacionades amb el tractament <p>Entre un 5-25% dels casos es transforma a LMA i quasi la totalitat van precedits de l'aparició d'alteracions citogenètiques addicionals.</p>

En els últims anys els **estudis moleculars** han revolucionat la patogènesi i diagnòstic de les NMP(12). Totes aquestes entitats tenen un origen clonal en la cèl·lula stem i una gran diversitat fenotípica que està relacionada amb diferents esdeveniments oncogènics (mutacions i gens de fusió) que freqüentment involucren una proteïna amb activitat tirosinasa(6).

De la mateixa manera que la presència del cromosoma Philadelphia i/o reordenament *BCR-ABL* confirma el diagnòstic de la LMC, el fet que darrerament s'hagin descobert algunes anomalies genètiques implicades en la patogènia de les NMP Ph- clàssiques, com la mutació V617F del gen *JAK2*(13), així com la major apreciació de les característiques histològiques i la seva correlació amb les característiques clíniques ha fet que a la revisió de la OMS 2008 s'inclouin aquests criteris per identificar els subtipus de NMP.

La majoria de les NMP s'associen a alteracions clonals dels gens que codifiquen per proteïnes tirosina cinases (PTK) o els seus receptors. Les anomalies descrites fins ara inclouen translocacions o mutacions puntuals en dits gens, donant com a resultat unes PTK anormals que activen vies de transducció de senyal i provoquen una proliferació anormal.

Figura 1: Mecanismes d'activació de l'activitat quinasa JAK2 per mutacions en les vies de senyalització



JAK2 és una tirosina cinasa localitzada al cromosoma 9p24 que forma part de la via de transducció de senyal de molts receptors de creixement hemopoètics (Figura 1). Han aparegut diversos treballs que posen de manifest que una mutació puntual en aquesta tirosina cinasa podria ser la responsable de moltes de les característiques de la policitemia vera (PV), la trombocitèmia essencial (TE) i la mielofibrosi primària (MFP). La presència o absència d'aquesta mutació ajudarà al diagnòstic d'algunes neoplàsies mieloproliferatives. Si més no el resultat ens ajudarà a discriminar entre neoplàsies mieloproliferatives i processos reactius, ja que s'ha trobat aquesta mutació en un 90-95% dels casos de PV, 40-50% en TE i MFP(8) i no s'ha trobat en processos reactius.

La mutació més comú és la *JAK2V617F* i es tracta d'una mutació puntual que produeix el canvi d'una Guanina (G) per una Timina (T) en l'exó 14 que comporta un canvi d'una Valina (V) per una Fenilalanina (F) en l'aminoàcid número 617 (Val617Phe).

Com hem dit, la mutació *JAK2V617* es troba pràcticament en tots els pacients amb PV i en els que no la presenten es pot trobar una mutació en el exó 12 de *JAK2* que també dona un augment de la funció de la proteïna. S'han trobat més de 15 mutacions diferents que es van descriure al 2007 i només s'han detectat a la PV amb una incidència < 2%.

En una proporció baixa de casos de MFP i TE es troben mutacions/reordenaments en els gens *MPLW515L* o *W515K*(8) (Taula 6).

A l'any 2006 es van identificar mutacions en el codó 515 del gen *MPL*. El gen *MPL* es localitza al cromosoma 1 i codifica pel receptor de la trombopoetina (TPO), les mutacions més freqüents són la *W515L* i *W515K*. Es detecten en un 5-11% de les MFP i en un 9% de les TE que són *JAK2V617F* negatives i mai s'han trobat a la PV. S'han trobat pacients amb múltiples mutacions del gen *MPL*, així com la seva coexistència amb la mutació *JAK2V617F*.

Taula 6: Alteracions moleculars associades a les NMP clàssiques Ph-

Alteració	Malaltia	Freqüència
<i>JAK2V617F</i>	PV	90-95%
	TE	40-50%
	MFP	40-50%
<i>JAK2</i> exó 12	PV	2%
<i>MPLW515L/K</i>	MFP	8%
	TE	8%*

*en casos *JAK2V617F* negatius

En la última revisió de la OMS 2008(1) s'ha modificat l'algoritme pel diagnòstic de PV, TE i MFP incloent l'estat mutacional de *JAK2* o l'activació de mutacions similars i les característiques histològiques de la biòpsia de la medulla òssia com a criteris diagnòstics.

En els últims anys s'han identificat altres alteracions genètiques que podrien tenir un paper en aquestes entitats, com ara mutacions dels gens *TET2*, *ASXL1*, *CBL*(12,14-16).

TET2 de la família *TET* es localitza al cromosoma 4q24, sembla que està implicat en els processos de proliferació i diferenciació cel·lular i podria ser un gen supressor de tumors. Les mutacions de *TET2* són molt inespecífiques; s'han trobat mutacions en un 17% de pacients *JAK2V617F* positius (16% de PV, 5% de TE i 17% de MFP)(7,17,18) i en un 7% dels *JAK2V617F* negatius i en altres processos mieloides. Poden estar associades a altres alteracions genètiques i generalment es tracta de mutacions adquirides. S'han fet estudis en NMP clàssiques que no relacionen aquest gen amb la supervivència, la transformació leucèmica ni esdeveniments trombòtics.

El gen ***CBL*** es localitza al cromosoma 11q23.3 i codifica per una ubiquitina que fa una regulació negativa de la transducció de senyal per tirosinases activades. Aquestes mutacions s'han identificat en diferents processos; no són específiques de cap d'elles. En un estudi amb 577 pacients diagnosticats de NMP o NMP/SMD on s'inclouen 74 pacients amb PV, 24 amb TE i 53 amb MFP es va identificar un 6% de mutacions en l'exó 8 o 9 del gen *CBL*(7,17). Es va trobar un cas d'adquisició de la mutació durant la progressió de la TE a mielofibrosi (MI) post-TE. S'han de realitzar més estudis per esbrinar la seva implicació en la patogènesi de la MFP o MI post-TE/PV i el seu possible paper en la transformació leucèmica.

El gen ***ASXL1***(8,17-19) localitzat al cromosoma 20q11.1 està involucrat en la remodelació de la cromatina i no es coneix la seva funció a la hematopoesi. Les mutacions més freqüents es donen a l'exó 12 i originen proteïnes truncades. Amb una incidència del 15% en NMP en general, en un 8% en les NMP clàssiques i en un 20% de les transformades a LMA, també s'identifiquen en SMD i LMMC; tampoc són específiques de les NMP tot i que podrien participar en la iniciació i en la progressió de la neoplàsia.

El gen ***IDH1*** es localitza al cromosoma 2q33.3 i l'***IDH2*** al cromosoma 15q26.1 i codifiquen per una isocitrat deshidrogenasa(17,19). Les mutacions d'aquests gens van ser descrites per primer cop en gliomes, després en LMA i altres tumors; ambdues són mútuament excloents.

També s'han descrit en LMA post-NMP. La freqüència en NMP és inferior al 5%.

Gen **IKZF1** es localitza al cromosoma 7p12 i codifica per factors de transcripció IKAROS que tenen un important paper en la regulació de la hematopoesis i en la diferenciació limfoide(19). Se li suposa un important paper en la transformació leucèmica; un estudi recent va demostrar que era rar trobar delecions de **IKZF1** a la fase crònica de les NMP (0,2%) però en pacients amb LMA post-NMP es detectava en un 21%(17).

Hi ha autors (F. Passamonti et al) que relacionen alguns d'aquests gens en la fase crònica de les NMP (**JAK2** exó 12, **MPL**, **TET2**, **LNK**, **EZH2**) mentre que d'altres es trobarien més a les fases de transformació blàstica (**NF1**, **IDH1/2**,**ASXL1**,**CBL**,**IKZF1**)(19,20)

Un resum dels molts gens sotmesos a estudi en la actualitat es recull a la Taula 7(3,20).

Tabla 7: Gens involucrats a la patogènesi de les NMP

GEN	Localització	Funció	Processos (%)
JAK2	9p24	Tirosina kinasa, senyalització Guany de funció	TE 50-70% PV 95-99% MFP 40-50%
MPL	1p34	Receptor, senyalització Guany de funció	TE 4% MFP 11%
LNK	12q24	Adaptador, regulació senyal Pèrdua de funció	TE <5% MFP <5% Eritrocitosi JAK- 25% LAM post NMP 13%
CBL	11q23	Adaptador, ligasa ubiquitina E3, regulació senyal Regulació negativa	MFP 6% LAM post NMP
SOCS1	16p13.2	Ligasa ubiquitina E3, regulació senyal Metilació	TE 14-25% PV 11-13% MFP 17%
SOCS2	12q22	Ligasa ubiquitina E3, regulació senyal Metilació	Todos los NMP 28%
SOCS3	17q25.3	Ligasa ubiquitina E3, regulació senyal Metilació	TE 10% PV 22%
NRAS	1p13.2	GTPasa, senyalització Guany de funció	LAM post NMP 7-13%
NF1	17q11.2	RAS regulació senyal Deleció	MFP 0-6% MF post-TE/PV 14%
TET2	4q24	ADN hidroximetilació Pèrdua de funció	PV 15% TE 4-11% MFP 19% LAM post NMP 26%
ASXL1	20q11.21	Modificacions cromatina Pèrdua de funció	PV I TE <7% MFP 19-40% LAM post NMP 19%
EZH2	7q35	Metilació cromatina Pèrdua de funció	PV 3% MFP 13%
IKZF1	7p12	Factor de transcripció, limfopoesi Deleció	LAM post NMP 13%
RUNX1	21q22.3	Factor de transcripció, hemopoesi Pèrdua de funció	LAM post NMP 37%
RB	13q14	Cicle cel·lular, apoptosi Deleció	MFP 19%
TP53	17p13.1	Cicle cel·lular, apoptosi Pèrdua de funció	LAM post NMP 20%
IDH1	2q33.3	Metabolisme Enzim neomòrfic	MFP 2% LAM post NMP 5%
IDH2	15q26.1	Metabolisme Enzim neomòrfic	LAM post NMP 2% LAM post NMP 18%

3. Hipòtesi

Les NMP cròniques Filadèlfia negatives (TE, PV i MFP) són trastorns clonals de les cèl·lules mare hematopoètiques caracteritzats per la proliferació d'una o més línies mieloides. Fins a l'actualitat no s'ha trobat cap marcador biològic específic pel seu diagnòstic, però la identificació de la mutació *JAK2V617F* ha estat fonamental i junt amb el cariotip s'utilitzen habitualment pel seu diagnòstic, tot i que no s'han incorporat a la estratificació del risc

La hipòtesi del present treball de recerca és la següent:

En els malalts amb NMP cròniques Filadèlfia negatives, l'estat mutacional del *JAK2* podria estar relacionat amb les dades clíniques, de laboratori i citogenètiques.

4. Objectius

1. Caracteritzar les alteracions citogenètiques en els casos de NMP Ph negatives.
2. Valorar la freqüència de *JAK2* en aquestes malalties.
3. Correlacionar les alteracions citogenètiques i l'estat mutacional del *JAK2*.
4. Analitzar si existeix una possible relació amb l'estat mutacional del *JAK2* i les dades de laboratori (leucòcits, Hb, plaquetes).
5. Analitzar si existeix una possible relació amb l'estat mutacional del *JAK2* i les dades clíniques (esplenomegàlia, complicacions, símptomes constitucionals)
6. Analitzar si existeix una possible relació entre la SG i la SLP amb l'estat mutacional del *JAK2*.

5. Material i mètodes

5.1. Número de pacients

L'estudi inclou els pacients diagnosticats de NMP del Servei d'Hematologia de l'ICO-Badalona del Hospital Germans Trias i Pujol, ICO-Hospitalet del Hospital Duran i Reynals, ICO-Girona del Hospital Josep Trueta, i comarcals de l'àrea d'influència (HES, HMB, Calella, Mataró, Granollers, Mollet...) durant els últims 10 anys. S'han estudiat un total de 526 casos diagnosticats de TE (n=348), PV (n=135), MFP (n=43) segons els criteris de la OMS de 2008 i de conformitat amb la Declaració d'Hèlsinki. D'aquests pacients en 205 hi havia l'estudi citogenètic en el moment del diagnòstic i l'anàlisi molecular de tots ells. 243 eren homes i 283 dones amb edats compreses entre 14 y 93 anys, amb una mitjana de 63 anys.

5.2. Dades clíniques i paràmetres analítics

Es van recollir en una base de dades clíniques: edat, sexe, tractament, factors de risc cardiovascular, si hi havia símptomes constitucionals, esplenomegàlia palpable o radiològica, antecedents, progressió, complicacions i si estaven vius o la causa d'èxitus.

Els paràmetres analítics valorats van estar: plaquetes, Hb, leucòcits, blasts en sang perifèrica, massa globular, EPO en sang, FAG, creixement de colònies, fibrosis moll d'os, estudi citogenètic i estudi molecular de *JAK2*.

5.3. Estudis citogenètics:

Per l'estudi citogenètic es parteix d'una mostra de MO que es processa segons el protocol del laboratori i s'estudien 20 metafases al microscopi òptic.

Metodologia

Arriba la mostra de medul·la òssia (MO) que es transporta en un tub cònic de 10 mL amb tap de rosca que conté 5 mL RPMI 1640 + 1% heparina sòdica. Cal que sigui la primera fracció de medul·la òssia aspirada.

Es fa el cultiu de 24h sense estimular en un flascó amb medi de cultiu i es suplementa amb 1mL de sèrum boví fetal i s'afegeix una gota d'hepes (amb xeringa de 1 ml).

Primer el tub amb la mostra es centrifuga a 1700 rpm durant 10', així s'aconsegueix eliminar el greix i tenir un cultiu més net.

Es treu el sobrenedant amb la pipeta Pasteur estèril i s'homogeneïtza el botó cel·lular. Llavors afegim 0.5 mL de mostra al flascó de cultiu.

Seguidament es posa el cultiu a l'estufa de CO₂ al 5% a 37°C±2°C durant 24h.

Al dia següent es processa el cultiu: Abans de treure el cultiu de l'estufa, afegirem al flascó 50λ de Colcemid (antimitòtic que atura la divisió cel·lular) que actuarà durant 20' en els cultius de 24h.

Seguidament fem un xoc hipotònic: La mostra es decanta en un tub de centrífuga i es centrifuga a 1700 rpm durant 10'. Finalitzat el procés s'aspira el sobrenedant i es llença. S'afegeixen a la mostra de 3 a 4 pipetes Pasteur de KCl (0,075M) (prèviament calentat a 37±1°C) i es resuspèn el botó cel·lular després d'haver afegit cada pipeta. Es deixa actuar el xoc hipotònic 30' a 37±1 °C perquè es trenqui la membrana de les cèl·lules.

Passat el temps, s'afegeixen 10 gotes de fixador carnoy (metanol - àcid acètic 3:1) a cada tub i es resuspèn. Es deixa actuar durant 10' a temperatura ambient. A continuació es fan les fixacions: es centrifuga a 1700 rpm durant 10, s'aspira el sobrenedant i es llença. Es posen tres pipetes de fixador, i es resuspèn després de cada pipeta de fixador i es centrifuga. Es repeteix l'operació mínim dues vegades més.

Finalment es realitzen les extensions i la tinció: després de l'última centrifugació es resuspèn el botó cel·lular i es realitzen les extensions a mà alçada (tres o quatre per cultiu). S'eixuguen en una placa calefactora i en un microscopi invertit es controlarà la qualitat de cada extensió.

Les preparacions s'envelleixen per temperatura (1 hora aproximadament a 100°C).

Primer es fa una prova de tinció amb una preparació, s'introdueix a la solució 2xSSC a 65±1°C i es renten amb aigua de l'aixeta. Es tenyeix amb una part de colorant Wright i tres parts de solució Sörensen (1mL+3mL per mostra, pipeta de vidre aforada), aproximadament 2'30". Si els cromosomes han quedat ben bandejats es tenyeixen la resta d'extensions de la mateixa manera, si no és així, es fa un altre prova.

Amb aquest tipus de tinció s'aconsegueix un patró de bandes G. I finalment es realitza l'estudi dels cromosomes al microscopi òptic segons el patró de bandes G que és característic per cada cromosoma. Sempre que sigui possible s'analitzaran un mínim de 20 metafases. L'expressió del resultat es farà segons el "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN-2008).

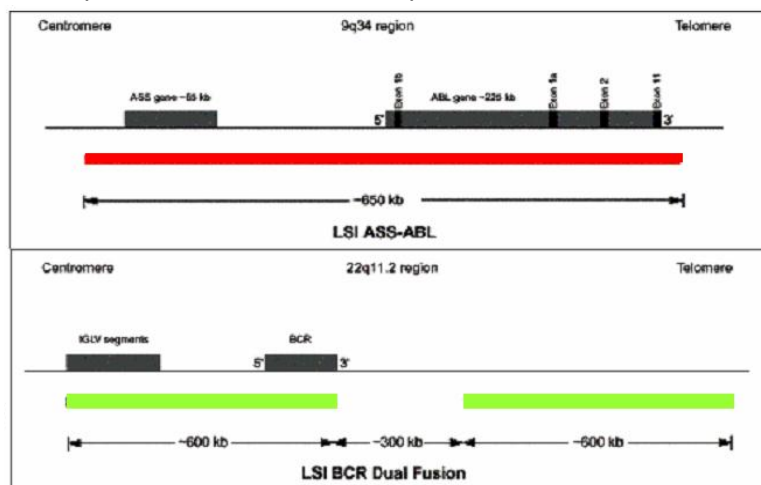
5.4. Estudis de FISH

Pel diagnòstic de les NMP Ph- és imprescindible descartar el cromosoma Philadelphia i el reordenament *bcr/abl* i això es pot fer per tècniques d'hibridació "in situ" (FISH) o be, per tècniques de biologia molecular.

La FISH és una tècnica que utilitza sondes d'ADN marcades amb un fluorocrom per detectar anomalies genètiques o cromosòmiques d'una cèl·lula. Es basa en la propietat de l'ADN de desnaturalitzar-se (separar-se la doble hèlix) i d'hibridar (unir-se per complementarietat de bases) a una seqüència complementària.

El tipus de sonda que s'utilitza és una Dual Color, Single Fusion. LSI t(9;22) *BCR/ABL*. És Dual Color per detectar reordenaments de dos gens: el *BCR* i l'*ABL* (Figura 2).

Figura 2: Esquema dels cromosomes implicats i la sonda utilitzada



Aquests estudis es realitzen sobre extensions cel·lulars del producte processat dels cultius.

Metodologia

Es fan extensions a mà alçada sobre portaobjectes i es marquen les àrees d'hibridació amb el llapis de diamant.

Es prepara la sonda d'hibridació i per això es descongela la sonda a T^a ambient i protegida de la llum. Per a cada àrea d'hibridació, es prepara un tub eppendorf amb 3,5µl de tampó d'hibridació, 0,5µl de sonda i 1µl d'aigua destil·lada. Centrifugar durant 1-3 segons (spin). Passar pel vòrtex i tornar a centrifugar.

Mentre es prepara la cambra humida (estufa o Thermobryte) a 37°C i la placa d'hibridació a 74°C.

Aplicar els 5µl de la barreja anterior que conté la sonda damunt l'àrea a hibridar i ràpidament, cobrir amb un cobreobjectes de 18x18 mm i segellar amb cola. Deixar damunt la placa calefactora durant 3 minuts a 74°C per a que es desnaturalitzi la mostra i la sonda. Passat aquest temps introduir els portaobjectes en una cambra humida a 37°C i incubar durant tota la nit a les fosques per a que hibridin.

Al dia següent es fan els rentats post-hibridació per eliminar l'excedent de sonda i les unions inespecífiques. Es treuen els cobreobjectes i es banyen les extensions en solució 0.4xSSC / 0.3% detergent Tween20 a 72°C ±1 durant 2 minuts.

Després es submergeixen les extensions en solució 2xSSC / 0.1% detergent Tween20 a T^a ambient entre 5 i 60 segons.

Es deixen eixugar els portaobjectes en vertical, a l'aire i a les fosques. Per a la seva visualització s'aplica 10µl de DAPI II (reactiu de contrast) sobre l'àrea d'hibridació i es cobreix amb un cobreobjectes.

Aquestes preparacions es mantenen al congelador a -20°C i a les fosques uns 5 minuts per a que pugui la intensitat de la fluorescència.

Ara ja es poden valorar al microscopi de fluorescència (làmpada de mercuri) equipat amb els filtres adequats per als fluorocroms de les sondes. Es conten un total de 200 nuclis i es donen els resultat segons el "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN-2008).

5.5. Estudis moleculars: estudi de les dos isoformes més freqüents de *BCR/ABL* i l'estat mutacional del gen *JAK2*

5.5.1. Reacció en cadena de la polimerasa pel gen de fusió *BCR/ABL*.

La tècnica de la PCR s'utilitza per la detecció del gen de fusió *BCR/ABL* que es forma com a conseqüència de la t(9;22)(q34;q11) formant el cromosoma Ph.

En funció de per on produeixi el trencament obtenim una proteïna de diferent pes molecular:

- M-bcr (p210: típica de LMC),
- m-bcr (p190: típica de LA-B)

Principi analític:

Consisteix amb l'amplificació del gen de fusió *BCR/ABL* per poder detectar si està present a la mostra.

Metodologia

Es parteix de l'ADNc que hem obtingut per la tècnica de retrotranscripció a partir de les cèl·lules totals de SP o MO i es treballa amb un control positiu i un control negatiu.

Comencem fent una primera amplificació del trànsit *BCR/ABL*, PCR1. En cada microtub de PCR de 0.2mL es posa:

- ADNc: 3µl
- Buffer PCR 10X: 5 µl
- MgCl₂ 50mM: 2.5µl
- dNTPs 10mM: 1µl
- Primer Forward: 1.25µl
- Primer Reverse: 1.25µl
- Taq Polimerasa 5U/µl: 0.4µl
- Aigua destil·lada: 35.6µl

En el moment del diagnòstic es realitza la PCR per descartar les dues isoformes del gen de fusió *BCR/ABL* i posem uns *primers* diferents per cada una d'elles. Així doncs:

- **P210:** P210-F: BCR-b1-A: 5'-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC-3'
P210-R: ABL-a3-B: 5'-GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'

- **P190:** P190-F: BCR-e1-A: 5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3'
P190-R: ABL-a3-B: 5'-GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'

Les condicions de reacció d'aquesta primera PCR1 són:

- Desnaturalització: 94°C, 5 minuts
- Amplificació:
 - 35 cicles: 94°C, 30 segons
 - 65°C, 30 segons
 - 72°C, 30 segons
- 72°C, 7 minuts
- 8°C, indefinidament

Expressió dels resultats:

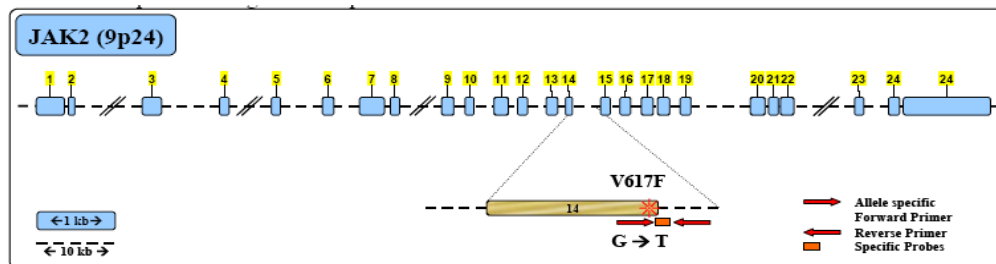
Es visualitza el producte de PCR en l'aparell QIAxcel, sistema d'electroforesi capil·lar d'alta resolució.

En els controls positius ha de sortir una banda de mida entre 169-521pb en funció de la isoforma, mentre que en els pacients no s'espera trobar cap banda

5.5.2. Descripció de la tècnica de discriminació al·lèlica com a eina bàsica per la detecció de la mutació puntual del gen *JAK2V617F*.

La mutació puntual es produeix pel canvi d'una Guanina (G) per una Timina (T) en l'exó 14 que comporta un canvi d'una Valina per una Fenilalanina en l'aminoàcid número 617 (Val617Phe) del gen *JAK2* (Figura 3).

Figura 3: Esquema del cromosoma 9 a la regió on es troba el gen *JAK2V617F* i la seva mutació



Principi analític:

S'utilitza la tecnologia de fenotipat a temps final que es basa en la utilització de dues sondes específiques (una per la forma mutada i una altra per la forma wild-type). Es realitza una PCR amb els primers específics i les dues sondes. Es fa una lectura de fluorescència abans i

després de fer la PCR i és aquesta diferència de fluorescència la que ens permet distingir una forma mutada d'una forma wild-type.

Medodologia

Es parteix de l'ADN obtingut a partir de les cèl·lules de SP o MO i es treballa sempre en duplicat tant per les mostres com pels controls.

Degut a que el volum final de la PCR és de 20 µL, en cada pou de la placa de 96 es posa:

2 µL d'ADN

1.5 µL de cada un dels primers (forward i reverse) a 10 M

0.5 µL de cada sonda (mutat i wild-type) a 10 M

10 µL de LightCycler 480 Probes Master

4 µL d'aigua destil·lada

Els primers forward i reverse per al gen JAK2 són:

JAK2-FW: 5'-CTTTCTCACAAGCATTGTTTAAA-3'

JAK2-RV: 5'-GCTCTGAGAAAGGCATTAGAAAGC-3'

La sonda per a les formes wild-type i mutades són:

JAK2-MUT: 5'-6Fam-TATGGAGTATGTTTCTGTGGAG-MGB-3'

JAK2-WT: 5'-VIC-TTATGGAGTATGTGTCTGTGGA-MGB-3'

Els cicles i les temperatures de la PCR són:

- Desnaturalització: 1 cicle sense anàlisi:
95°C durant 10 minuts
- Amplificació: 40 cicles de PCR amb quantificació:
95°C durant 10 segons
60°C durant 30 segons
- Refredament: 1 cicle sense anàlisi:
40°C durant 10 segons

Expressió de resultats

L'anàlisi de les dades obtingudes després de l'amplificació es fa a través de l'opció "Endpoint Genotyping for Samples" on el software t'indica la fluorescència final de l'eix de les X (forma WT) respecte la fluorescència de l'eix de les Y (forma mutada). A part de la taula de valors on el mateix

software t'indica amb quin percentatge de fiabilitat la nostra mostra és WT (Allele X), mutada (Allele Y) o presenta els dos al·lels (Both Alleles), ens dóna una gràfica (Endpoint Fluorescence Scatter Plot) on les mostres es distribueixen segons la fluorescència sobre l'eix de les X i les Y.

Es considerarà un pacient com a mutat sempre i quant la mitja de les dues rèpliques per la fluorescència mutada estigui significativament per sobre de la del control WT.

5.6. Anàlisis estadístics

Es va realitzar una anàlisi descriptiva de les característiques demogràfiques i clíniques bàsics, calculant-ne la mitjana i desviació estàndard o la mediana i el rang (mínim i màxim) per variables quantitatives i les freqüències i percentatges en cas de variables categòriques. L'associació entre aquestes variables i els diferents grups d'estudi, es va estudiar amb la prova de la Chi-quadrat per variables categòriques, i la comparació de mitjanes es va dur a terme mitjançant el test de la t de Student, el model ANOVA o el test de la U de Mann-Whitney, en cas corresponent. Les corbes actuàries per la SG i la SLP es van dur a terme amb el mètode de Kaplan-Meier i es van comparar amb el test log-rank. Tota l'anàlisi estadística es va realitzar amb el software estadístic SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versió 15, i es va considerar significació estadística si $p < 0.05$.

6. Resultats

Es van estudiar un total de 526 pacients. 243 eren homes (46,2%) i 283 dones (53,8%). L'edat mediana de la cohort va se de 63 anys (extrems 14-93). Els malalts es van distribuir en tres grups segons la seva malaltia: 348 TE (62,8%), 135 PV (24,4%), 43 MFP (7,8%).

Del total de 526 pacients, 250 tenien l'estudi citogenètic al moment del diagnòstic però en 45 (18%) d'ells no es va obtenir creixement i es van descartar per fer l'anàlisi de resultats, partint d'un total de 205 pacients. El 7,3% d'aquests pacients presentaven un cariotip alterat al diagnòstic amb una distribució per malalties segons es resum a la Taula 8. L'estudi del *JAK2* es va realitzar en 444 pacients dels 526 totals amb un 63,8% *JAK2* mutat amb una distribució per diagnòstics segons s'expressa a la mateixa taula (Taula 8):

Taula 8: Resultats dels estudis citogenètics i moleculars expressats en funció del seu diagnòstic.

DIAGNÒSTICS	CITOGÈNÈTICA		<i>JAK2</i>	
	Alterats	Normals	Mutat	Normal
TE	5 (3,8%)	127 (96,2%)	180 (60,8%)	116 (39,2%)
PV	2 (3,8%)	51 (96,2)	82 (74,6%)	28 (25,5%)
MFP	8 (40,0%)	12 (60,0%)	21 (55,3%)	17 (44,7%)
TOTAL	15 (7,3%)	190 (92,7%)	288 (63,8%)	161 (36,3%)

Les anomalies citogenètiques que vam trobar al moment del diagnòstic es recullen a la taula següent (Taula 9):

Taula 9: Cariotips alterats al moment del diagnòstic

Cariotip alterat
46,XY,del(13)(q12q14)[2]/46,XY[18]
46,XY,del(20)(q11.2)[20]
46,XY,del(20)(q11.2)[20]
Cariotip complex
47,XY,+8,del(13)(q12q14)[4]/46XY[3]
47,XY,+8,14q-?[1] Confirmació FISH+8
46,XY,+8, der(15)...
46,XX,del(7)(q22)[3]/46,XX[17]
45,X,-Y[18]/46,XY[2]
48,XX,+8,+9
46,XX,del(20)(q11)[1]/46,XX[6] confirmat per FISH
46,XY,der(7),t(1;7)[10]/46,XY[10]
46,XY,t(7;16)(q22;q13)[20]
46,XY,inv(9)(p11;q13)[20].
46,XX,der(7)t(1;7)(q10;p10)[17] // 46,XX[20]

6.1. Correlació entre les alteracions citogenètiques i la progressió de la malaltia

Dels 18 pacients que van progressar 3 havien presentat alteracions al diagnòstic, un 16,7% dels pacients amb cariotip alterat havien progressat, la resta de pacients (83,3%) que havien progressat tenien cariotip normal. Hi havia un 6,5% dels pacients amb cariotip alterat que no havien presentat progressió. No s'ha trobat una correlació significativa entre tenir el cariotip alterat al diagnòstic i la progressió de la malaltia.

6.2. Correlació entre les alteracions citogenètiques i *JAK2*

De 205 pacients que tenien l'estudi citogenètic al diagnòstic, 15 (7,3%) el tenien alterat i d'aquests pacients amb el cariotip alterat el 73,3% presentaven la mutació de *JAK2V617F*, mentre que, el 26,7% de pacients amb cariotip alterat, eren normals pel gen *JAK2*. Dels 138 pacients amb cariotip normal el 72,6% tenien la mutació *JAK2V617F*. Així doncs, no es van trobar diferències significatives entre el grup de pacients amb la mutació *JAK2V617F* i el fet de tenir un cariotip alterat o normal.

A la revaluació dels pacients al moment de la progressió (n=23), disposem d'estudi citogenètic en 16 casos, 9 dels quals tenien un cariotip alterat, i d'aquests, 7 (77,8%) eren *JAK2V617F* mutats al diagnòstic i 2 *JAK2* normal (22,2%). Mentre que dels altres 7 amb cariotip normal 4 (57,1%) presentaven la mutació de *JAK2V617F* i 3 (42,9%) no. En la progressió de la malaltia tampoc es van trobar diferències significatives en el grup de pacients *JAK2V617F+* segons si la citogenètica era normal o alterada a la progressió.

6.3. Correlació entre les dades clíniques i *JAK2*

Les dades clíniques que hem valorat en aquest estudi són: presència o no d'esplenomegàlia, símptomes constitucionals i complicacions de tipus trombòtic i hemorràgic en el curs de la malaltia. Aquests paràmetres s'han relacionat amb la presència o absència de la mutació *JAK2V617F* (Taula 10).

Taula 10: Resum de les dades clíniques objecte del nostre estudi. (p: significació estadística)

		JAK2V617F+	JAK2V617F-	subtotals	totals	p
esplenomegàlia	No	293(68,8%)	133(31,2%)	426	509	p=0,150
	Si	64(77,1%)	19(22,9%)	83		
síntomes constitucionals	No	310(70,6%)	129(29,4%)	439	508	p=0,261
	Si	44(63,8%)	25(36,2%)	69		
complicacions	No	301(67,2%)	147(32,8%)	448	507	p=0,016
	Si	49(83,1%)	10(16,9%)	59		

Segons aquests resultats veiem que 83 de 509 pacients tenen esplenomegàlia i d'aquests el 77,1% presenten la mutació per *JAK2*, comparat amb 68,8% de pacients sense esplenomegàlia i *JAK2+*. Per tant no es troben diferències significatives entre aquests dos paràmetres (p=0,150).

El mateix passa amb els pacients que havien presentat símptomes constitucionals en el curs de la malaltia: el 63,8% eren *JAK2+* i el 70,6% *JAK2-* (p=0,261).

En canvi quan analitzem els pacients segons si han presentat o no complicacions si que trobem una correlació significativa entre aquests paràmetres: el 83,1% dels pacients amb complicacions eren *JAK2+* mentre el 16,9% eren *JAK2-* (p=0,016)

6.4. Correlació entre els paràmetres de laboratori i *JAK2*

La taula següent (Taula 11) resum els valors dels paràmetres de laboratori recollits en aquest estudi segons si els pacients presentaven la mutació de *JAK2V617F* o eren normals pel gen *JAK2*.

Taula 11: Resum dels paràmetres de laboratori contemplats al nostre estudi.

	Límits normals	Plaq x10 ⁹ /L		Hb g/L		Leucos x10 ⁹ /L	
		150 - 400		115 - 135		4,5 - 13,5	
		Estat mutacional <i>JAK2</i> V617F	<i>JAK2</i> +	<i>JAK2</i> -	<i>JAK2</i> +	<i>JAK2</i> -	<i>JAK2</i> +
TE	Mediana	761,29	836,78	144,82	133,23	10,88	8,66
	δ	265,6	367,5	15,9	14,9	6,5	2,4
	Mitjana	703,00	788,00	146,00	134,00	9,60	8,35
	Min	214	144	73	67	1,00	4,30
	Max	2.336	2.574	178	167	65,90	16,30
	p	p=0,115		P<0,001		P<0,001	
PV	Mediana	484,47	317,70	177,53	179,74	13,97	9,91
	δ	194,7	229,9	23,4	17,1	16,3	3,0
	Mitjana	479,50	250,00	177,50	184,00	10,95	9,20
	Min	89	134	106	128	1,62	5,92
	Max	1.106	1.078	229	202	121,70	16,00
	p	P<0,001		p=0,478		p=0,095	
MFP	Mitjana	354,84	231,35	114,40	117,59	15,06	14,99
	δ	291,9	230,0	33,5	20,8	15,6	24,0
	Mediana	309,00	195,00	112,00	120,00	11,40	5,30
	Min	26	16	45	70	2,50	1,80
	Max	1.211	798	174	158	75,00	91,40
	p	p=0,106		p=0,848		p=0,098	

δ : desviació típica

Plaq: plaquetes

Hb: hemoglobina

Leucos: leucòcits

A més d'aquestes dades es va estudiar els blasts en SP respecte a la mutació de *JAK2* però en tots ells els valors eren pròxims a 0 blasts en SP i no havien diferències significatives en quant a l'estat mutacional del gen; a excepció de la MFP que en algun cas apareixia algun blast: en el grup de *JAK2* mutat donava una mitjana de 0,96 ($\delta=2,53$) i amb uns límits de 0-12 i en els no mutats una mitjana de 0,73 ($\delta=1,91$) amb uns límits de 0-7 ($p=0,455$) sense trobar tampoc diferències significatives.

Al analitzar els valors obtinguts per cada malaltia veiem:

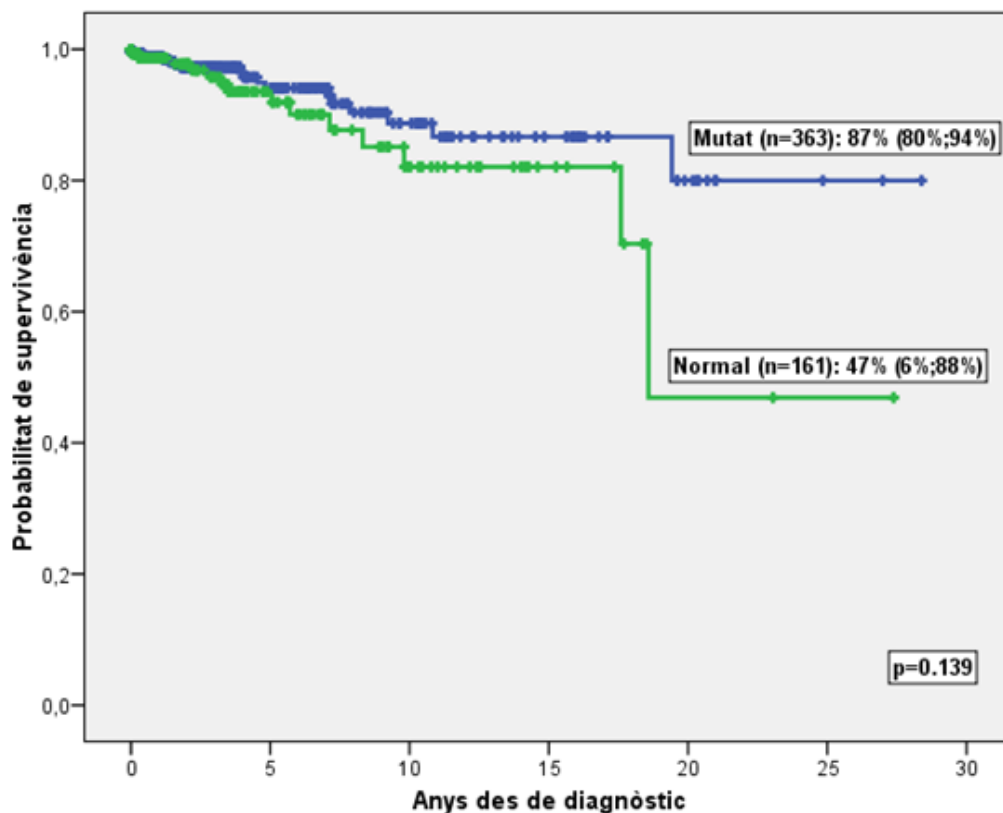
- En el cas de TE tant la xifra de plaquetes com la de leucòcits i la concentració d'hemoglobina superen els límits de la normalitat (Taula 10). Quan dividim els grups de pacients segons l'estat mutacional de *JAK2* trobem diferències significatives en la xifra de leucòcits ($p<0,001$) i en la concentració d'hemoglobina ($p<0,001$) que tenen valors superiors en el grup de *JAK2* mutat que en el *JAK2* normal, però no hi ha diferències en la xifra de plaquetes (Taula 11).
- A la PV veiem que la xifra de plaquetes i leucòcits és normal i la concentració d'hemoglobina és superior als límits de normalitat (Taula 10). Quan mirem les diferències segons si està o no mutat

JAK2 trobem que només hi ha diferències significatives en el cas de la xifra de plaquetes. Els pacients amb *JAK2+* tenen major quantitat de plaquetes que els *JAK2-* (484,4 vs 317,7 $p < 0,001$) (Taula 11).

- A la MFP la xifra de plaquetes és normal, mentre que, la xifra de leucòcits i la concentració d'hemoglobina superen els límits de la normalitat (Taula 11), però en cap cas no hi ha diferències significatives segons si *JAK2* està mutat o és normal.

6.5. Correlació entre la Supervivència Global i *JAK2*

Figura 4: Supervivència Global (SG) en tots els pacients



Segons es veu a la gràfica (Figura 4) considerant tot el grup de pacients, trobem que la Supervivència Global (%) als 15 anys amb un interval de confiança (IC) del 95% és en el cas dels pacients amb la mutació de *JAK2V617F* ($n=363$) del 87% (80%-94%), mentre que pels pacients sense la mutació ($n=161$) és del 47% (6%-88%) sense que hi hagin diferències significatives entre els dos grups ($p=0,139$)

A l'analitzar la SG per diagnòstics com es mostra a les gràfiques següents (Figura 5, 6 i 7), tampoc trobem diferències entre els pacients *JAK2* mutat i salvatge.

Figura:5:Supervivència Global (SG) per la TE

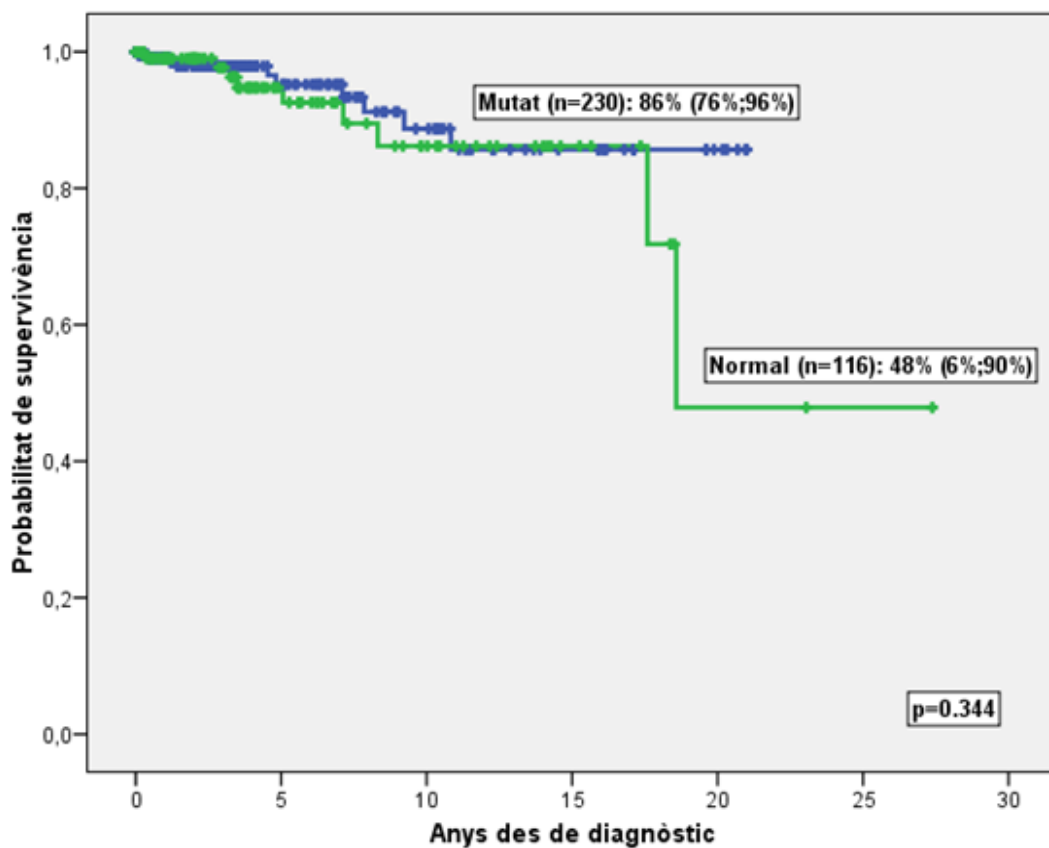


Figura:6:Supervivència Global (SG) per la PV

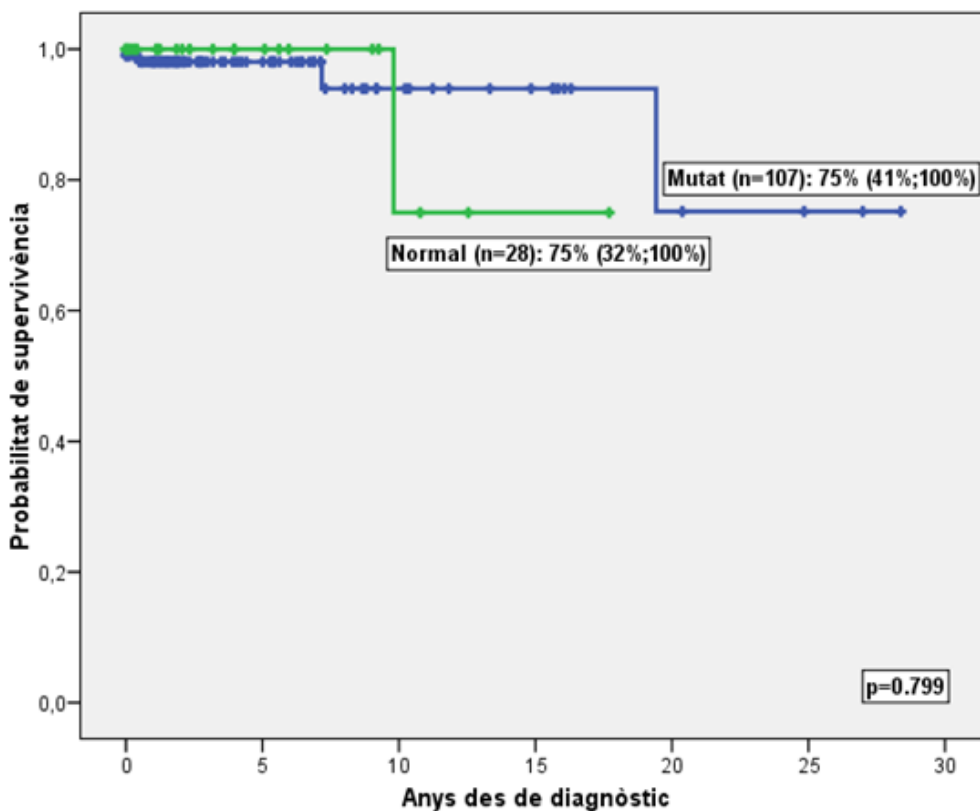
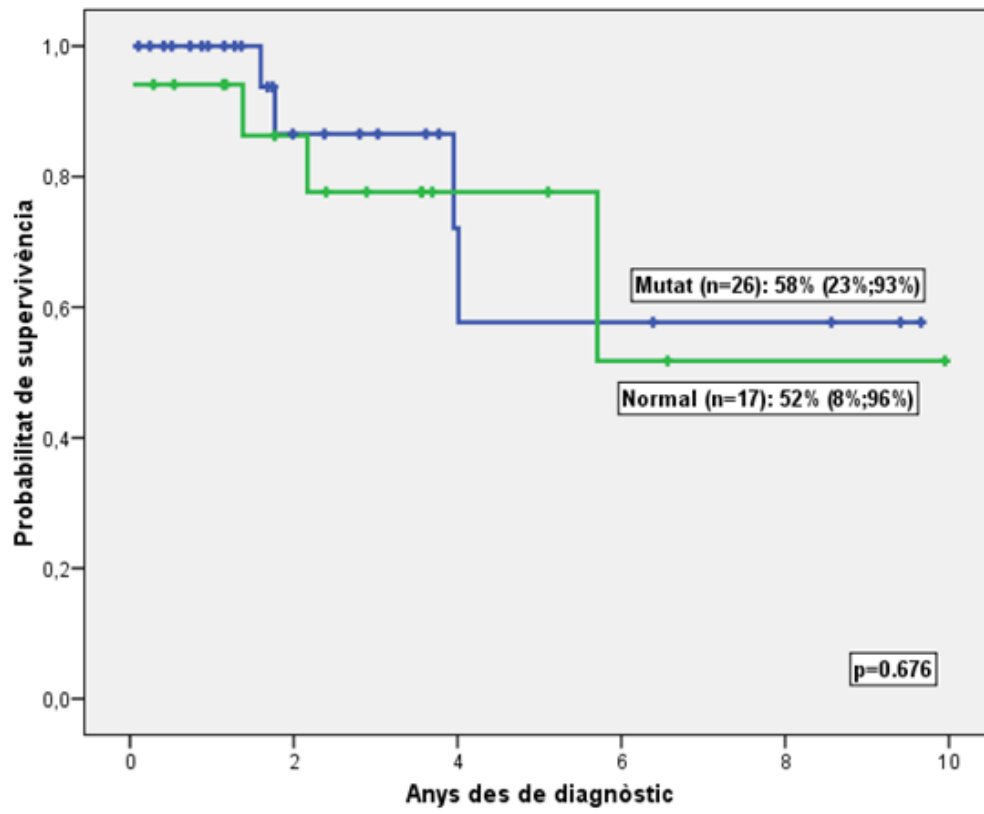


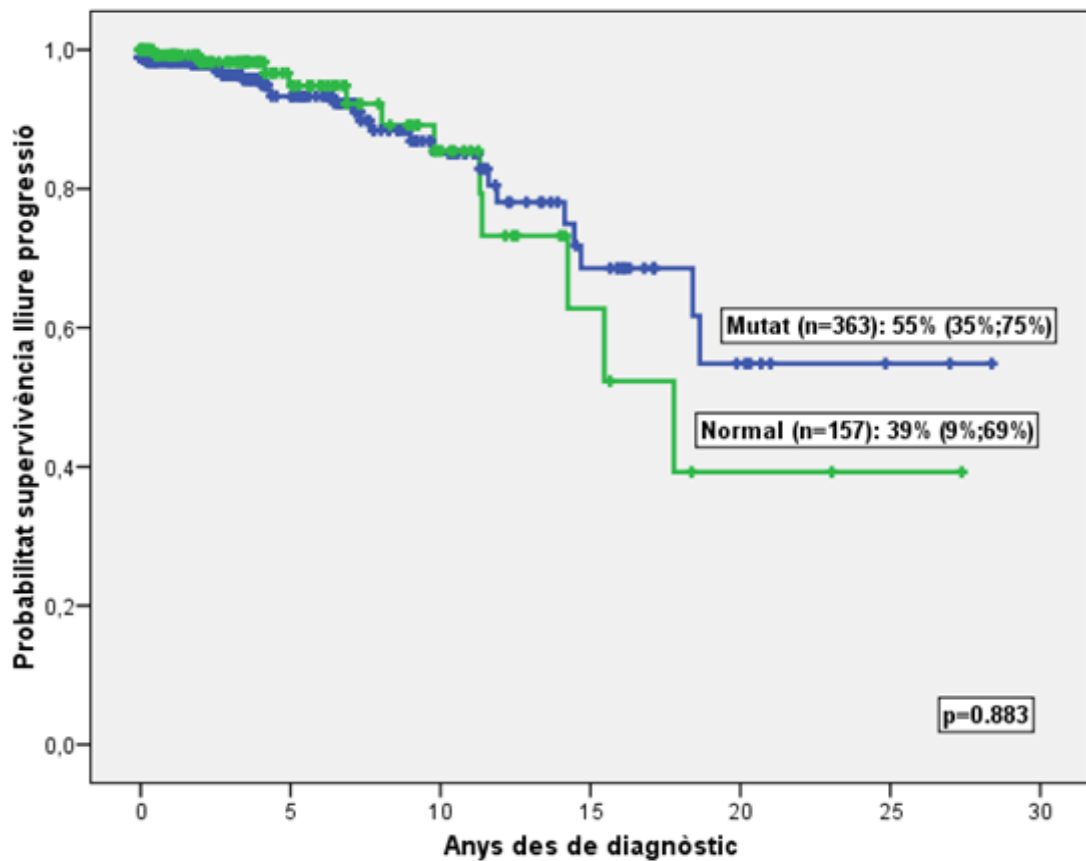
Figura:7:Supervivència Global (SG) per la MFP



6.6. Correlació entre la Supervivència Lliure de progressió i JAK2

Al igual que vèiem amb la SG a la gràfica de SLP (Figura 8) amb tot el grup de pacients trobem que en el cas dels pacients amb la mutació de *JAK2V617F* (n=363) la SLP és del 55% (35%-75%), mentre que pels pacients sense la mutació (n=157) és del 39% (9%-69%) sense que hi hagin diferències significatives entre els dos grups ($p=0,883$) i al mateix passa a analitzar-ho per diagnòstics (Figures 9, 10 i 11)

Figura 8: Supervivència Lliure de Progressió (SLP) per tots els pacients



Per diagnòstics:

Figura 9: Supervivència Lliure de Progressió (SLP) per la TE

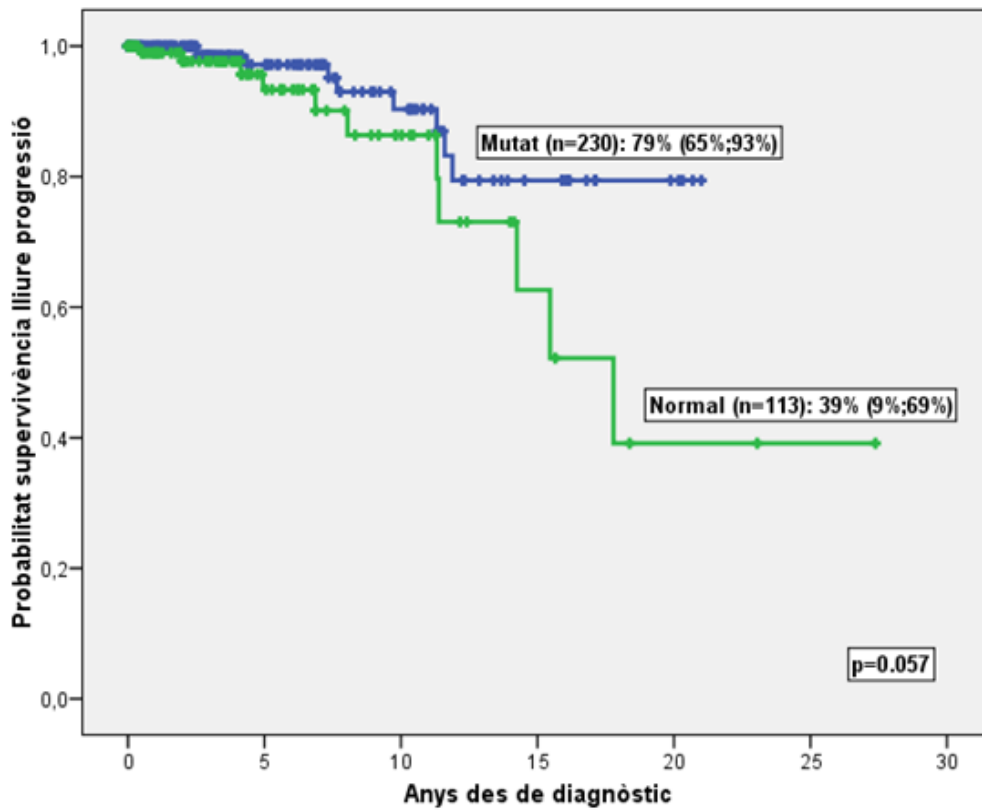


Figura 10: Supervivència Lliure de Progressió (SLP) per la PV

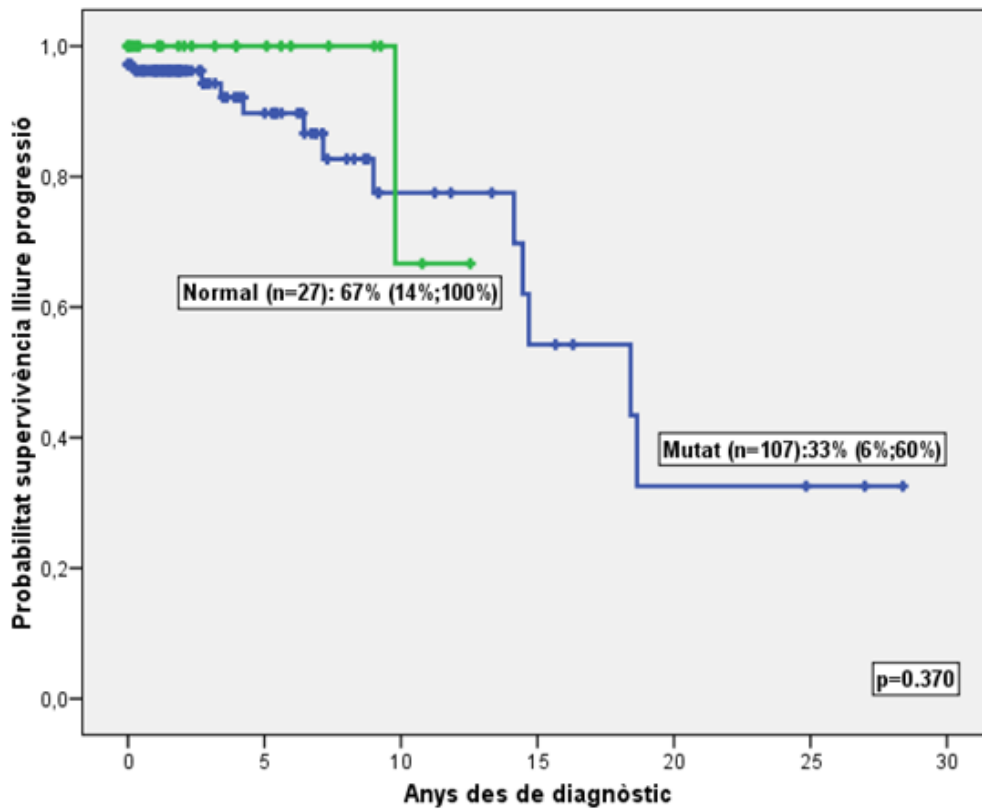
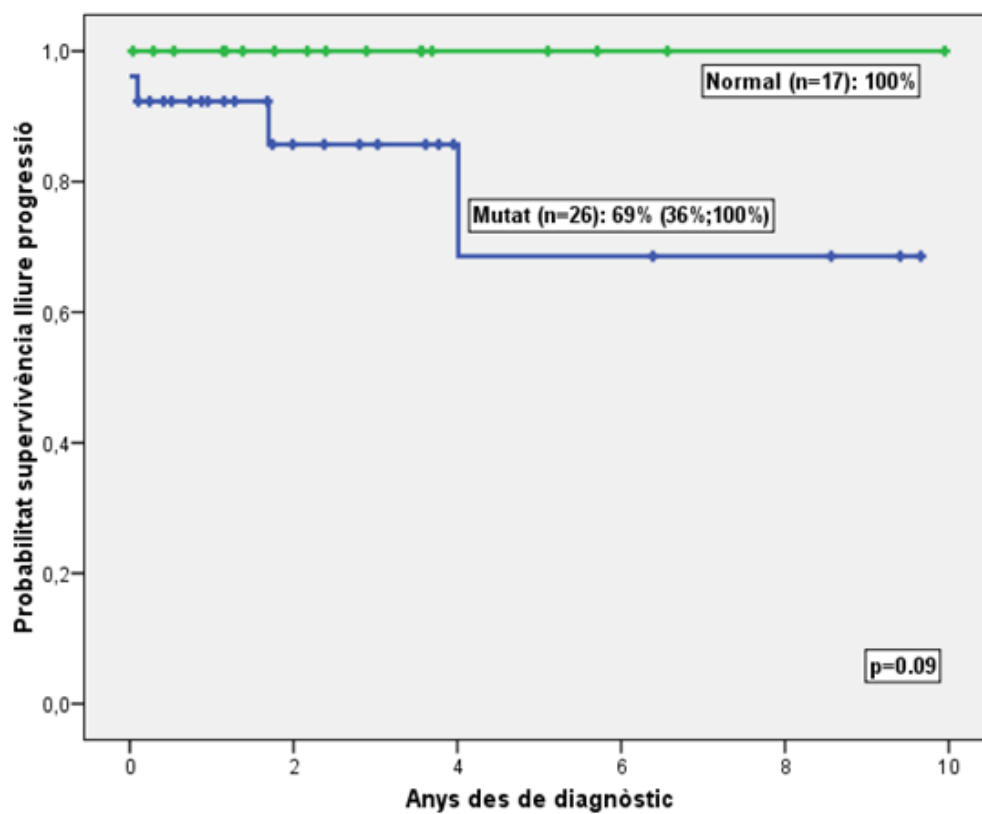


Figura 11: Supervivència Lliure de Progressió (SLP) per la MFP



Llavors, la SG i SLP no depenen de l'estat mutacional de *JAK2*.

7. Discussió

El nostre treball és un estudi prospectiu que correlaciona l'estat mutacional del gen *JAK2V617F* amb les alteracions citogenètiques al moment del diagnòstic i en la progressió(16), amb les dades clíniques (esplenomegàlia, símptomes constitucionals i complicacions en el curs de la malaltia), amb paràmetres de laboratori com ara: xifra de plaquetes, Hemoglobina, leucòcits i % de blasts en SP i el pronòstic de 526 pacients diagnosticats segons els criteris de la OMS (2008) de NMP cròniques Filadèlfia negatives (TE, PV i MFP) recollits en el nostre centre.

Respecte a la freqüència de la malaltia en el nostre centre en el grup de les NMP cròniques Filadèlfia negatives la més freqüent és la TE amb un 62,8%, seguida de la PV 24,4% i per últim MFP un 7,8%.

La freqüència d'alteracions citogenètiques en el nostre estudi en el conjunt de malalties és d'un 7,3% inferior al 20% descrit a la literatura(1). Quan fem l'estudi a partir del grup de pacients amb alteracions citogenètiques al diagnòstic, la seves freqüències i distribució per malalties si s'ajusta una mica més al que hi ha descrit, així nosaltres trobem un 3,8% en la TE (segons l'OMS oscil.la entre un 5-10%), un 3,8% en la PV (front un 20%) i un 40% en la MFP d'alteracions que estaria dins dels valors trobats a la literatura (entre un 30-75%) i aquestes freqüències d'alteracions augmentarien amb la progressió de la malaltia.

En els nostres resultats un 16,7% dels pacients amb cariotip alterat i un 6,5% dels pacients amb cariotip normal al diagnòstic havien progressat. Per tant no podíem relacionar una citogenètica alterada al diagnòstic i la progressió de la malaltia. Tampoc vam trobar correlació entre la citogenètica i l'estat mutacional del gen *JAK2V617F* al moment del diagnòstic, però en el moment de la progressió disposàvem de la citogenètica de 16 pacients dels quals 9 tenien un cariotip alterat i 7 dels 9 pacients eren *JAK2+(21)*(16).

Hi ha algun grup, com Dunlap et al(16), que si ha trobat correlació entre la citogenètica i *JAK2*. Aquestes diferències poden ser degudes al grup de pacients que analitzem, perquè en fases avançades de les malalties augmenta el nombre d'anomalies citogenètiques trobades i aquesta podria ser la causa de les diferències trobades en els resultats amb alguns grups.

En el nostre treball d'un 7,3% de cariotips alterats el 73,3% presentaven la mutació i de la resta de pacients amb cariotip normal (n=138) el 73,6% eren *JAK2+*. Per tant, no hi havia diferències significatives entre el grup de pacients *JAK2+* i cariotip alterat o normal. A la nostra sèrie la freqüència d'alteracions citogenètiques és molt baixa.

A la progressió es repetia el mateix. De 23 pacients teníem la citogenètica de 16, dels quals 9 tenien el cariotip alterat i d'aquests el 77,8% eren *JAK2*+. I dels 7 pacients restants amb cariotip normal el 57,1% eren *JAK2* mutat.

Al correlacionar l'estat mutacional de *JAK2V617F* amb les dades clíniques: l'esplenomegàlia i els símptomes constitucionals eren independents de la mutació de *JAK2* i al comparar-ho amb les complicacions en el curs de la malaltia si que trobem una correlació significativa on veiem que els pacients amb *JAK2* mutat tenen major probabilitat de presentar complicacions com ara trombosis o hemorràgies.

Ahora vam analitzar la relació entre l'estat mutacional de *JAK2* i alguns dels paràmetres del laboratori. En quant a la xifra de plaquetes, leucòcits i concentració d'hemoglobina si que hi havia correlació significativa segons si es tractava del grup amb el *JAK2* mutat o salvatge i la malaltia. A la MFP no va haver diferències entre els dos grups.

A la TE el grup de pacients *JAK2* mutat la xifra de plaquetes i Hb era superior a les del grup de *JAK2* salvatge mentre que a la PV la xifra de plaquetes augmentava en el grup *JAK2* mutat. Sembla que la mutació de *JAK2V617F* està associada amb un fenotip mieloproliferatiu més pronunciat.

Quan volem relacionar l'estat mutacional de *JAK2V617F* amb les SG i SLP s'ha vist que la presència o no de la mutació tant en tot el grup de NMP cròniques Ph- clàssiques, com individualment en cada una d'elles no es correlacionen, es a dir la SG i la SLP no depenen de l'estat mutacional de *JAK2*, tot i que si que hem trobat que els pacients amb la mutació tenen més probabilitat de presentar complicacions.

A l'actualitat molts grups estan estudiant altres gens, la majoria tirocina quinases per tal de trobar un marcador específic per aquestes malalties i que ajudi al seu diagnòstic i estratificació de risc, però fins al moment, encara no s'ha trobat.

8. Conclusions

1. La freqüència d'alteracions citogenètiques trobades en el nostre estudi és inferior al descrit a la literatura, però les anomalies descrites en aquest treball són les mateixes que a la resta de grups. No hem trobat cap correlació entre les alteracions citogenètiques al diagnòstic i el pronòstic. L'estudi citogenètic és important però no és específic, ni aclaridor en el diagnòstic d'aquestes malalties.
2. A la nostra sèrie hem trobat una freqüència global pel grup de NMP cròniques Filadèlfia negatives (TE, PV i MFP) d'un 63,8% de pacients amb el gen *JAK2* mutat. La freqüència de pacients amb *JAK2* mutat per cada una de les malalties s'ajusta a les freqüències descrites a la literatura. Tot i no ser específic és un bon marcador de clonalitat i orienta en el diagnòstic d'aquestes malalties.
3. Els nostres resultats mostren que al moment del diagnòstic, el nombre d'anomalies citogenètiques pel grup de pacients *JAK2* mutat és similar al trobat en el grup de *JAK2* salvatge. Per tant, la presència d'una citogenètica alterada al moment del diagnòstic de les NMP cròniques Filadèlfia negatives és independent de l'estat mutacional del gen *JAK2*.
4. A l'analitzar els paràmetres del laboratori (plaquetes, leucòcits i hemoglobina) segons la malaltia i l'estat mutacional del gen *JAK2*, trobem:
 - El grup de pacients amb TE i *JAK2* mutat, la xifra de leucòcits i la concentració d'hemoglobina són superiors als valors del grup de pacients amb TE i *JAK2* salvatge. Per tant, si que hi ha una correlació.
 - En el grup de pacients amb PV i *JAK2* mutat la xifra de plaquetes és superior que en el grup de *JAK2* salvatge.
 - Els paràmetres de laboratori valorats en el nostre estudi en el cas de la MFP demostren que no hi ha diferències entre el grup de pacients *JAK2* mutat i *JAK2* salvatge, possiblement

degut a que es tracta del grup amb un nombre de pacients més reduït de la nostra sèrie.

En general podem dir que aquells pacients que tenen el *JAK2* mutat tenen un fenotip més mieloproliferatiu.

5. A l'anàlisi de les dades clíniques, l'esplenomegàlia i els símptomes constitucionals són independents de l'estat mutacional de *JAK2*. Mentre que en quant a les complicacions en el curs de la malaltia, si que trobem una correlació significativa tenint una major probabilitat de tenir complicacions el grup de pacients amb el gen *JAK2* mutat.

6. A l'analitzar la SG i la SLP amb tot el grup de pacients o bé per diagnòstics i l'estat mutacional de *JAK2*, tampoc trobem diferències significatives entre el pacients amb el gen *JAK2* mutat i els pacients amb el gen *JAK2* salvatge. La SG i la SLP no depenen de l'estat mutacional de *JAK2*.

9. Bibliografia

- (1) Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009;115(17):3842-3847.
- (2) L. Zamora. Caracterització biològica de la trombocitèmia essencial i la policitemia vera. Tesi Doctoral Barcelona: Facultat de Ciències, UAB; 2005.
- (3) Abdel-Wahab O, Manshour T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70(2):447-452.
- (4) Fukushima N, Ichinohe T, Kimura S. Myeloproliferative neoplasms (including chronic myeloid leukemia). *Rinsho Ketsueki* 2012;53(1):59-70.
- (5) Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 4ª ed. Madrid: Acción Médica; 2000.
- (6) Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification. *Int J Lab Hematol* 2010;32(5):461-476.
- (7) Grand F, Cross NP. Atypical myeloproliferative disorders: new insights into pathogenesis. *Haematologica* 2010;95(extra1):196-200.
- (8) Gómez Casares MT, López Jorge, C.E., Perera M., Molero T. Diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas en la práctica diaria. *Haematologica* 2010;95(extra1):200-207.
- (9) Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011;29(4):392-397.
- (10) Campbell LJ. Cytogenetics of myeloproliferative neoplasms. *Methods Mol Biol* 2011;730:89-98.
- (11) Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Salido M, Solé F. Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence in situ hybridization. *Haematologica* 2003;88(1):110-111.
- (12) Collins L. Myeloproliferative neoplasms: the role of molecular markers. *Clin Lab Sci* 2011;24(3):183-186.
- (13) Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106(6):2162-2168.

- (14) Brecqueville M, Cervera N, Adelaide J, Rey J, Carbuccia N, Chaffanet M, et al. Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J* 2011;1(8):e33.
- (15) Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(8):743-755.
- (16) Dunlap J, Kelemen K, Leeborg N, Braziel R, Olson S, Press R, et al. Association of JAK2 mutation status and cytogenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2011;135(5):709-719.
- (17) Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24(6):1128-1138.
- (18) Vannucchi AM, Biamonte F. Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2011;96(10):1398-1402.
- (19) Passamonti F, Maffioli M, Caramazza D, Cazzola M. Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget* 2011;2(6):485-490.
- (20) Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118(7):1723-1735.
- (21) Zamora L, Xandri M, Garcia O, Marce S, Xicoy B, Granada I, et al. Association of JAK2 mutation status and cytogenetic abnormalities at diagnosis in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2012;137(4):677-678.