



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a:

Director/es:

Santander,

20

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	HEMATOPOYESIS.....	2
2.1.	SITIOS DE LA HEMATOPOYESIS	2
2.2.	ORGANIZACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	2
3.	REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	4
3.1.	AUTORRENOVACIÓN VERSUS DIFERENCIACIÓN.....	4
3.2.	SELECCIÓN DEL LINAJE	5
3.3.	PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA HEMATOPOYESIS	6
3.3.1.	M-CSF (CSF-1).....	7
3.3.2.	GM-CSF.....	7
3.3.3.	G-CSF	7
3.3.4.	EPO	8
3.3.5.	TPO	8
3.4.	PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEMATOPOYÉTICA	9
3.4.1.	Vía JAK / STAT.....	9
3.4.2.	Vía RAS/MAPK/ERK	11
3.4.3.	Vía PI3-K/AKT.....	12
3.4.4.	Vía CSF3R/G-CSF.....	12
4.	NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.....	13
4.1.	PRINCIPALES NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	13
4.2.	MUTACIONES EN MPN	15
4.3.	MUTACIONES CONDUCTORAS: FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN	15
4.4.	MUTACIONES EN GENES ADICIONALES.....	19
5.	POLICITEMIA VERA	20
5.1.	EPIDEMIOLOGÍA	20
5.2.	PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON PV.....	21
5.2.1.	SÍNTOMAS GENERALES	21
5.2.2.	COMPLICACIONES MICROVASCULARES	22
5.2.3.	TROMBOSIS	22
5.2.4.	OTRAS MANIFESTACIONES.....	24
5.3.	EVOLUCIÓN NATURAL DE LA PV	25
5.3.1.	PROGRESIÓN A FIBROSIS.....	25
5.3.2.	TRANSFORMACIÓN LEUCÉMICA	25
6.	MUTACIONES CONDUCTORAS EN LA PV.....	26

6.1.	Mutación JAK2V617F	26
6.2.	MUTACIONES EN EL EXÓN 12 de JAK2.....	28
6.3.	CONSECUENCIAS MUTACIONALES.....	28
7.	MUTACIONES SOMATICAS ADICIONALES	29
7.1.	MUTACIONES EN REGULADORES EPIGENÉTICOS	31
7.1.1.	ASXL1.....	31
7.1.2.	EZH2	33
7.1.3.	TET2 y DNMT3A	34
7.2.	MUTACIONES EN EL COMPLEJO DEL ESPLICEOSOMA.....	36
7.3.	MUTACIONES EN REGULADORES TRANSCRIPCIONALES.....	36
8.	SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE PRONÓSTICO	37
9.	TRATAMIENTO DE LA POLICITEMIA VERA.....	38
9.1.	PREVENCIÓN DE TROMBOSIS.....	39
9.2.	TRATAMIENTOS CITORREDUCTORES	40
9.2.1.	QUIMIOTERAPIA.....	40
9.2.2.	INTERFERÓN	40
9.2.3.	INHIBIDORES DE JAK2.....	41
10.	NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS.....	45
10.1.	REGULACIÓN EPIGENÉTICA	45
10.2.	INHIBIDORES DE HSP90	47
10.3.	INHIBIDORES DE MDM2	47
10.4.	INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS	47
10.5.	INMUNOTERAPIA	48
10.6.	AGENTES ANTIFIBRÓTICOS.....	49
11.	CONCLUSIONES	49
12.	BIBLIOGRAFIA.....	50
13.	ANEXO	54

RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas cromosoma Filadelfia negativas, incluida la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis primaria (PMF), se caracterizan por la expansión clonal de una célula hematopoyética pluripotente dando como resultado una excesiva producción de células sanguíneas maduras. Se han descrito mutaciones impulsoras clave: JAK2, CALR y MPL, todas las cuales actúan para activar constitutivamente la vía JAK-STAT. La presente revisión tiene como objetivo mostrar una visión general amplia de la señalización involucrada, haciendo especial hincapié en la policitemia vera. PV se caracteriza por una producción elevada de glóbulos rojos y la gran mayoría de los pacientes porta la mutación JAK2V617F, con un subconjunto menos frecuente con mutaciones en el exón 12 de JAK2. Además, se han identificado mutaciones somáticas adicionales en otros genes que afectan la regulación epigenética, la supresión de tumores, y otras vías de señalización lo que lleva a la modificación de algunas características de la enfermedad y agrega una capa de complejidad a su patogénesis molecular. Todos estos factores han puesto de relieve la amplia variedad de procesos y vías celulares implicados, cuyo conocimiento ha conllevado al desarrollado terapias dirigidas mucho más eficaces para el tratamiento de estas enfermedades.

Palabras clave: hematopoyesis, neoplasias mieloproliferativas, mutaciones conductoras, reguladores epigenéticos.

ABSTRACT

Chronic Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms, including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF), are characterized by clonal expansion of a pluripotent hematopoietic cell resulting in excessive production of mature blood cells. Key driver mutations have been described: JAK2, CALR, and MPL, all of which act to constitutively activate the JAK-STAT pathway. The present review aims to show a broad overview of the signaling involved, with particular emphasis on polycythemia vera. PV is characterized by elevated red blood cell production and the vast majority of patients carry the JAK2V617F mutation with a less frequent subset with mutations in exon 12 of JAK2. In addition, additional somatic mutations have been identified in other genes that affect epigenetic regulation, tumor suppression, and other signaling pathways, leading to the modification of some characteristics of the disease and adding a layer of complexity to its molecular pathogenesis. All these factors have highlighted the wide variety of cellular processes and pathways involved, the knowledge of which has led to the development of much more effective targeted therapies for the treatment of these diseases.

Key words: hematopoiesis, myeloproliferative neoplasms, driver mutations, epigenetic regulators.

ABREVIATURAS

- AML: Acute myeloid leukemia
- ASXL1: Additional sex combs-like gene
- BAP: Brahma Associated Protein
- Bcl-2: B-cell lymphoma 2
- BET: Bromodomain and extraterminal domain
- BRD: bromodomain
- CALR: calreticulina
- CBF- β : Core-binding factor subunit beta
- CBL: Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue
- CD: cluster of differentiation
- CFU: Colony forming Unit
 - CFU-BASO: Basophil
 - CFU-E: Erythrocyte
 - CFU-EO: Eosinophil
 - CFU-GEMM: Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte
 - CFU-GM: Granulocyte-Macrophage
 - CFU-L: Lymphocyte
 - CFU-MEG: Megakaryocyte
- CHIP: Clonal hematopoiesis of indeterminate potential
- CNL: Chronic neutrophilic leukemia
- CSF: Colony-stimulating factor
 - M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
 - G-CSF, o CSF 3: Granulocyte colony-stimulating factor
 - GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- DNMT3A: DNA cytosine-5-methyltransferase 3A
- EPO: Erythropoietin
- ERK: extracellular signal-regulated kinases
- ET: trombocitemia esencial
- EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
- FasR: Fas receptor
- FL: receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3
- FOG: Friend Of GATA
- FOXO3A: Forkhead box O3
- GAP: guanine activating protein
- GATA: GATA Binding Protein
- GEF: guanine nucleotide exchange factor
- GTP/ GDP: guanosine triphosphate/ guanosine diphosphate
- HAT: Histone acetyltransferase
- HDAC: Histone deacetylase
- HIF: Hypoxia-inducible factors
- HLA: Human leukocyte antigen
- HMT: Histone methyltransferase
- HOX: homeobox gene
- HRE: hypoxia responsive element
- HSC: Hematopoietic Stem cell
- HU: hydroxyurea
- IDH: Isocitrate dehydrogenase
- IFN- γ : Interferon gamma

- IL: Interleukins
- iPSS: International Prognostic Scoring System
- JAK: Janus Activated Kinase
- JMJD1C: Jumonji Domain Containing 1C
- MAPK: mitogen-activated protein kinase
- MDM2/MDM4: murine doble minute
- MDS: myelodysplastic síndrome
- MIPSS-PV: Mutation-Enhanced International Prognostic Systems for Polycythemia Vera
- MPN: Myeloproliferative neoplasms
- NFE2: Nuclear Factor Erythroid 2
- NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- NGS: next generation sequencing
- PcG: Polycomb-group protein
- PD1: programmed death 1
- PKB (AKT): serine/threonine-specific protein kinase
- PMF: Primary myelofibrosis
- PPM1D: Protein phosphatase 1D
- PPMF: mielofibrosis post-PV
- PRC: polycomb repressive complex 2
- PR-DUB: Polycomb repressive deubiquitinase
- PRMT5: Protein arginine N-methyltransferase 5
- PV: Policitemia Vera
- ROS: reactive oxygen species
- RUNX1: Runt-related transcription factor 1
- SCF: Stem Cell Factor
- SCL: stem cell leukemia hemopoietic transcription factor
- SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling
- SRSF2: Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
- STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
- TET2: Tet methylcytosine dioxygenase 2
- TFG β : transforming growth factor beta
- TGF- α : Transforming Growth Factor Alfa
- TP53: Tumor protein P53/ cellular tumor antigen p53
- TPO: Thrombopoietin.
- TYK2: Non-receptor tyrosine-protein kinase
- UDP: uniparental disomy
- VEGF: Vascular endothelial growth factor

1. INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (MPN) son trastornos clonales de la hematopoyesis, siendo las más relevantes en la práctica clínica, la leucemia mieloide crónica y las neoplasias mieloproliferativas crónicas cromosoma Filadelfia negativas. Estas últimas, comprenden la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células madres hematopoyéticas, caracterizadas por aumento de la proliferación eritroide, mieloide y megacariocítica que provoca un aumento de células maduras en sangre periférica.

Este trabajo tiene como objetivo revisar las bases moleculares y las vías de señalización implicadas en la génesis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, especialmente en la Policitemia Vera. Comenzaremos describiendo brevemente la hematopoyesis, haciendo especial hincapié en la regulación de la misma. La correcta señalización de las citoquinas es esencial, ya que activa vías de transducción de señales que transmiten la señal al núcleo y, finalmente, modulan la transcripción de genes reguladores. La proteína JAK2 es una quinasa que forma parte de la vía de transducción de señales JAK-STAT que utilizan los receptores de citoquinas tipo I como el receptor de la EPO, G-CSF, GM-CSF o la TPO.

Las neoplasias mieloproliferativas están asociadas a mutaciones directoras en los genes JAK2, CALR y MPL que conducen a una activación constitutiva de la señalización JAK-STAT, independiente de la regulación de citoquinas. De esta manera, tras revisar las manifestaciones clínicas principales de la PV, nos centraremos en estudiar las mutaciones y sus consecuencias moleculares. En el año 2005, se describió la presencia de la mutación JAK2V617F que produce una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando al receptor causando una activación permanente de esta vía de transducción de señales. Un pequeño porcentaje de pacientes con policitemia vera JAK2V617F negativos, presentan mutaciones en el exón 12 de JAK2.

La incorporación de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva ha permitido describir mutaciones no conductoras adicionales, con relevancia pronóstica y terapéutica. Por lo tanto, a continuación, se detallarán las mutaciones coexistentes en modificadores de cromatina, componentes del complejo de espirosomas, modificadores de metilación del ADN, supresores de tumores y reguladores de la transcripción cuyo número total está inversamente relacionado con la supervivencia y el riesgo de transformación leucémica. Las mutaciones más frecuentemente observadas están presentes en genes reguladores epigenéticos como TET2, ASXL1, DNMT3A y EZH2, así como en reguladores transcripcionales, incluyendo el supresor tumoral TP53.

Por último, examinaremos en profundidad las principales herramientas terapéuticas que existen actualmente para los pacientes con MPN y, gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes, algunas de las nuevas terapias que están en proceso de investigación, dirigidas específicamente a moléculas diana.

2. HEMATOPOYESIS

La sangre es uno de los tejidos más regenerativos de nuestro organismo. En ella surgen a diario un billón de células (10^{12}) mediante el proceso de hematopoyesis, que ocurre bajo condiciones muy específicas en la médula ósea. Esto implica un nivel muy alto de renovación celular, exigido por la necesidad de reemplazar las células sanguíneas maduras de manera rápida, dada su limitada vida media. Hoy en día, y gracias al avance en diversos campos de la biología molecular y celular, se ha logrado obtener un panorama muy amplio y detallado de este proceso y su regulación (Bates & Ekem, 2015).

2.1. SITIOS DE LA HEMATOPOYESIS

Todos los tipos celulares sanguíneos surgen de células madre hematopoyéticas de la médula ósea, el lugar principal de la hematopoyesis en adultos. Ernst Haeckel usó por primera vez la palabra célula madre (Stammzelle) en 1868, para referirse al organismo unicelular primordial del que descendía toda la vida multicelular. Desde el principio, el concepto de célula madre se ha enmarcado en un modelo de árbol, donde las células madre multipotentes dan lugar a su progenie a través de una serie ordenada de pasos de ramificación (Flores-figueroa & Pelayo, 2009).

El sistema hematopoyético se origina en el saco vitelino extra-embionario alrededor del día 21 de gestación, el cual se diferencia en células endoteliales por un lado y células hematopoyéticas por otro (Flores-figueroa & Pelayo, 2009). Varias líneas de evidencia sugieren que las células hematopoyéticas y endoteliales, pueden emerger de un progenitor común, el hemangioblasto, dando lugar tanto a las células como a los vasos sanguíneos (Bates & Ekem, 2015).

La eritropoyesis primitiva se desarrolla en los vasos sanguíneos fetales, el hígado y el bazo, mientras que las células granulocíticas no se producen en grandes cantidades hasta que la hematopoyesis se establece en la médula ósea. Al nacer, la actividad hematopoyética está distribuida en la médula ósea por todo el esqueleto humano, pero retrocede gradualmente con el tiempo, de modo que en la vida adulta, la hematopoyesis normal, se encuentra principalmente en la pelvis y esternón (con pequeñas cantidades en otros huesos como las costillas, cráneo y vertebras) (Bates & Ekem, 2015).

2.2. ORGANIZACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Morfológicamente las células madre indiferenciadas se parecen a pequeños linfocitos, muchas de las cuales se mantienen en fase G0 del ciclo celular. Dicho estado de reposo se mantiene gracias al factor de crecimiento transformante β (TFG β) cuya actividad está mediada por p53, un supresor tumoral que regula la proliferación celular. La consecuencia de todo esto es que las células madre permanecen quiescentes en el microambiente del estroma (Bates & Ekem, 2015).

De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos (Flores-figueroa & Pelayo, 2009) (ver esquema en Figura 1).

i) El primer compartimiento corresponde a las células más primitivas, llamadas células troncales hematopoyéticas (Hematopoietic Stem cell HSC). Estas células son capaces de auto-renovarse (gracias a la cual se mantiene la reserva de células madre) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos). Tienen una morfología linfoblastoide y expresan en su superficie antígenos como CD34, CD90, CD117 (también llamado c-KIT), CD133 y SCA1 (stem cell antigen) y ausencia de otros como CD33, CD38, o marcadores específicos de linaje (Flores-figueroa & Pelayo, 2009). CD34 es el marcador más conocido de células madre y de células progenitoras humanas y se trata de miembro de la familia de sialomucina de glucoproteínas, que son moléculas muy glucosiladas con capacidades potenciales de adhesión y señalización (Bates & Ekem, 2015).

ii) Las HSC dan origen a células progenitoras hematopoyéticas, las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Comparten ciertas características inmunofenotípicas con las células troncales hematopoyéticas, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje al que pertenecen (Flores-figueroa & Pelayo, 2009).

iii) Las células progenitoras hematopoyéticas dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología, las cuales, a pesar de ser inmaduras, pueden ser identificadas en frotis de médula ósea. Estas células constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90%).

iv) Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan las células sanguíneas circulantes (Flores-figueroa & Pelayo, 2009). Las células sanguíneas pertenecen a dos ramas fundamentales: linfoide y mieloide. La rama linfoide está formada por células que pertenecen al sistema inmune T, B y NK. Los linfocitos B y T, presentan receptores específicos en su membrana que les permiten tanto reconocer como generar respuestas específicas contra agentes concretos generando, además, memoria inmune. Los linfocitos NK en cambio, pertenecen a la inmunidad innata cuyas principales funciones son la citotoxicidad y la secreción de citoquinas (Doulatov et al., 2012).

El linaje mieloide incluye varios tipos de células de vida corta, completamente diferenciados y distintos entre sí. En primer lugar, los monocitos que forman parte tanto de la defensa inmune innata por medio de fagocitosis como de la adaptativa, actuando como células presentadoras de antígeno (HLA-II). En segundo lugar, tenemos los granulocitos, que incluyen los neutrófilos (fagocitos profesionales con un importante papel contra la defensa de bacterias piógenas), eosinófilos (células que tienen citotoxicidad frente a parásitos, especialmente helmintos tapizados por IgE) mastocitos y basófilos (contienen gránulos con sustancias vasoactivas, siendo protagonistas en reacciones de hipersensibilidad tipo I). En tercer lugar, los glóbulos rojos, encargados del transporte de oxígeno a los tejidos y por último las plaquetas, involucradas en la hemostasia y generación de trombos (Doulatov et al., 2012).

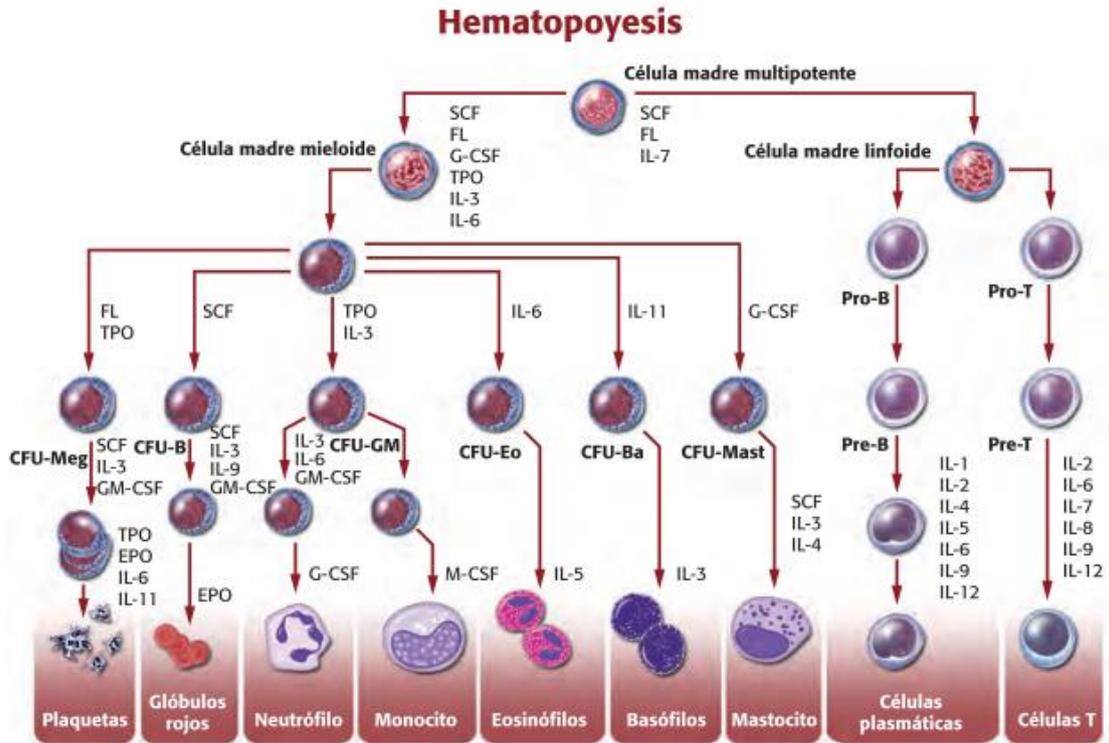


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis y lugares de actuación de los factores de crecimiento más importantes (Moraleda Jimenez, 2017).

3. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Para regenerar continuamente el sistema hematopoyético, se debe generar permanentemente el número correcto de tipos celulares específicos en el momento y lugar adecuados. Para lograr esto, las decisiones de destino, como, quiescencia versus proliferación, autorrenovación versus diferenciación, supervivencia versus muerte, deben elegirse constantemente en las células madre hematopoyéticas. Por tanto, un análisis exhaustivo de su control molecular y la interacción exacta, es fundamental para una comprensión completa de la hematopoyesis normal y patológica (Moraleda Jimenez, 2017).

3.1. AUTORRENOVACIÓN VERSUS DIFERENCIACIÓN

La elección de las HSC entre la autorrenovación y la diferenciación debe estar estrictamente regulada para permitir tanto la generación de células diferenciadas como el mantenimiento preciso del número de HSC correcto. Las señales extrínsecas de ligandos asociados a la matriz extracelular, solubles o unidos a la membrana del nicho, son necesarias para el comportamiento apropiado de las HSC (Bates & Ekem, 2015). Actualmente se propone que existen dos nichos principales, el osteoblástico endóseo y el endotelial perivascular. Además, la médula ósea, comprende una mezcla heterogénea de varios tipos de células que incluyen células sanguíneas, células mesenquimales, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, células reticulares, células grasas y muchos otros tipos, que también influirán en el destino hematopoyético.

A nivel unicelular, incluso las células madre hematopoyéticas son heterogéneas en su eficacia de reconstitución, lo que demuestra que no solo la autorrenovación y la diferenciación están controladas por el entorno, sino que existen reguladores intrínsecos de la funcionalidad de las HSC (Moraleda Jimenez, 2017).

Por ejemplo, el factor SCF (*Stem Cell Factor*), que es producido por las células del estroma, es capaz de unirse al receptor c-KIT expresado por las células madre hematopoyéticas y estimular su proliferación (Bates & Ekem, 2015). Sin embargo, a pesar de años de investigación, el mecanismo molecular exacto y los genes diana relevantes que inducen la expansión de las HSC siguen estando mal definidos (Moraleda Jimenez, 2017).

3.2. SELECCIÓN DEL LINAJE

La diferenciación de células multipotentes en diferentes linajes debe controlarse bien para permitir la producción oportuna del número y tipo correctos de células maduras. Entre otros, encontramos en primer lugar, el factor SCL, crucial para la especificación del destino hematopoyético durante el desarrollo de la hematopoyesis primitiva (saco vitelino) y definitiva (en el adulto), debido a que, en su ausencia, no se generan células sanguíneas (Rodríguez Juan, Domínguez Marilú, 2015).

El factor de unión central RUNX1 y su cofactor de unión CBF- β , también son necesarios para la transición de las células madre hematopoyéticas, pues en su ausencia, no existe hematopoyesis. Otro factor esencial es GATA2, y se ha propuesto como un marcador específico de células hematopoyéticas, además, su disminución afecta el compromiso de las células hacia los distintos linajes sanguíneos (ver esquema en Figura 2).

Los factores de transcripción GATA son una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unirse a la secuencia de DNA "GATA". Por ejemplo, GATA1 promueve la diferenciación hacia un linaje megacariocítico/eritroide y PU.1, induce diferenciación mieloide (en especial, granulocitos y monocitos). Estas proteínas interactúan de tal forma que cada uno inhibe la transcripción del otro y este antagonismo favorece la elección del linaje de la HSC. De esta manera, en estudios realizados en ratones, se ha visto que aquellos que no producen GATA1, aunque produzcan un número de colonias eritroides adecuado (CFU-E), hay una parada en la maduración del proeritroblasto y mueren de anemia severa (Bates & Ekem, 2015).

GATA2 es el segundo miembro de la familia de proteínas GATA y está implicado en la expansión de progenitores (Bates & Ekem, 2015). Su función es inducir la expresión de GATA1, que a su vez activa su propia expresión y reprime GATA2 (Rodríguez Juan, Domínguez Marilú, 2015). Además, el desplazamiento de GATA2 por GATA1 en el locus c-KIT, da como resultado un bucle de cromatina reordenado y una expresión de c-KIT regulada a la baja, lo que demuestra su capacidad para alterar directamente las interacciones de cromatina.

La familia NOTCH son otros de los factores de transcripción altamente conservados, involucrados en la proliferación, crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas. NOTCH se trasloca al núcleo donde participa en la formación de complejos de unión al DNA y regula la transcripción de diversos genes. El factor NOTCH1 es necesario para la generación de la hematopoyesis, ya que embriones deficientes de esta proteína son capaces de producir progenitores hematopoyéticos pero no HSC de largo plazo.

Por otra parte, en el desarrollo del linaje megacariocítico y eritroide; participan otros muchos factores de transcripción, como el cofactor FOG (Friend of GATA), y el antagonismo entre c-MafB, un factor altamente expresado en monocitos, y ETS1. La asociación de estos dos últimos factores, inhiben la transactivación mediada por ETS1 y en consecuencia, se bloquea la maduración eritroide (Rodríguez Juan, Domínguez Marilú, 2015)

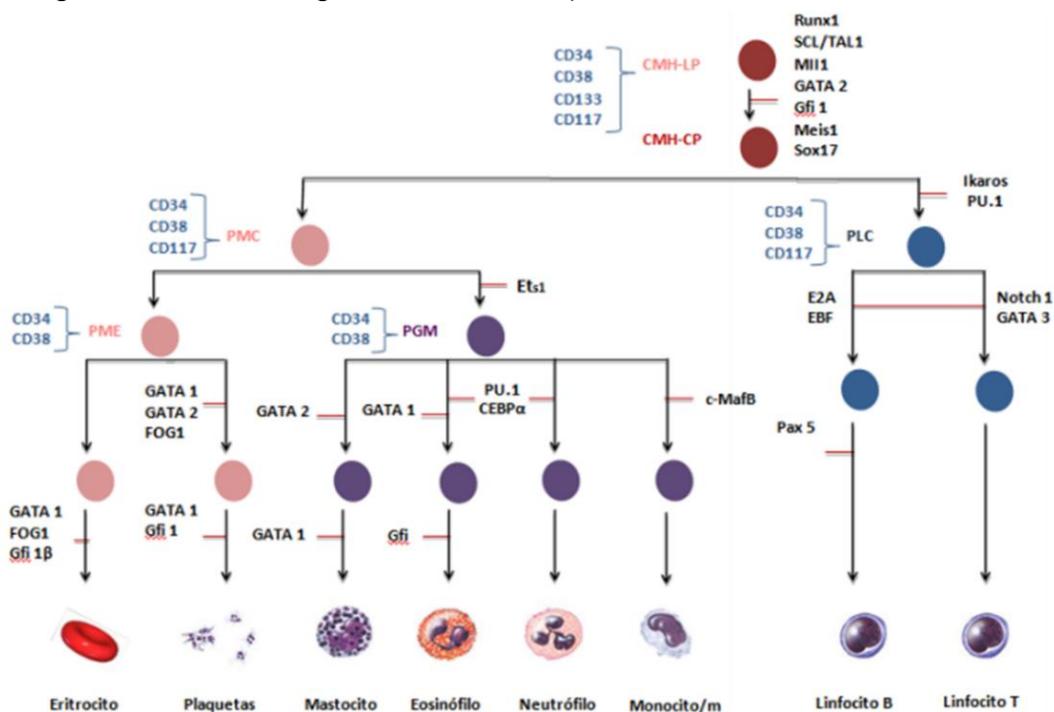


Figura 2. Factores de transcripción y marcadores de superficie (CDs) expresados durante la hematopoyesis. La Figura indica las etapas clave en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas, señalando los principales factores de transcripción expresados durante cada etapa de maduración, así como los principales marcadores de superficie (Rodríguez Juan, Domínguez Marilú, 2015).

3.3. PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA HEMATOPOYESIS

Los factores de crecimiento hematopoyéticos y citoquinas son glucoproteínas reguladoras solubles, que poseen características estructurales similares como la presencia de alfa hélices unidos por lazos beta (Tripathi & Carson, 2014).

Muchos de los receptores de dichas citoquinas son glucoproteínas transmembrana de tipo 1 con dominios extracelulares, y que dimerizan cuando se une su ligando. Así, por ejemplo, los receptores de G-CSF y de eritropoyetina (EPO) homodimerizan, mientras que los de las cadenas β de la interleuquina IL3, IL5 y receptores GM-CSF, dimerizan con una cadena beta común. Otros

miembros de la superfamilia de receptores (como IL6, IL11, IL12) requieren la presencia de una glucoproteína transmembrana gp130 para transducir la señal (Bates & Ekem, 2015).

Una vez que los factores de crecimiento se han unido a sus receptores en la superficie celular, activan vías de transducción de señales que transmiten la señal al núcleo y, finalmente, modulan la transcripción de genes reguladores. De esta manera, y como ejemplo, los precursores mieloides pueden diferenciarse en macrófagos y granulocitos según la presencia de dichos factores de crecimiento (Tripathi & Carson, 2014).

3.3.1. M-CSF (CSF-1)

El factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF o CSF-1, funciona uniéndose a su receptor CSF-1R cuya unión conduce a la dimerización y autofosforilación de los residuos de tirosina del receptor y da como resultado la activación de la ruta RAS / RAF / MAPK / ERK. Esto promueve el crecimiento y la diferenciación de macrófagos por lo que, niveles altos de CSF-1, pueden interferir con el desarrollo mielode adecuado, lo que podría resultar en la generación de neoplasias mieloproliferativas (Tripathi & Carson, 2014).

3.3.2. GM-CSF

Es un factor de crecimiento capaz de generar macrófagos y granulocitos a partir de precursores y funciona uniéndose al receptor G-CSFR de alta afinidad, el cual conduce a la activación de una serie de señales, incluidas las vías JAK / STAT, MAPK y PI3K (Tripathi & Carson, 2014). En condiciones de estado estacionario, los niveles circulantes de GM-CSF son bajos. Pero dependiendo de los niveles, GM-CSF puede poseer efectos inhibidores o estimulantes sobre el sistema inmunológico. A bajas concentraciones, GM-CSF aumenta la respuesta inmune al mejorar la presentación de antígenos por las células dendríticas. En cambio, altas concentraciones de GM-CSF, provocan la multiplicación de células supresoras mieloides, un grupo de heterogéneo de células inmaduras con fuerte actividad inmunosupresora. Al igual que el CSF-1, el GM-CSF está relacionado con la progresión del tumor y la metástasis. La presencia de GM-CSF en el estroma tumoral se asocia con el desarrollo de células mieloides inmaduras (Tripathi & Carson, 2014).

3.3.3. G-CSF

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) juega un papel fundamental durante el desarrollo de neutrófilos y en la granulopoyesis, estimulando así el desarrollo mielode. Existen hasta seis isoformas diferentes de G-CSFR que se generan debido a un procesamiento diferencial cuya sobreexpresión, se ha relacionado con determinadas leucemias mieloides. El dominio intracelular de G-CSFR contiene dos dominios denominados caja-1 y caja-2, cuya activación conduce a la activación de numerosas vías de señalización, incluida la vía JAK / STAT (Tripathi & Carson, 2014).

3.3.4. EPO

El factor de crecimiento eritropoyético o eritropoyetina (EPO), producido principalmente en el riñón adulto, circula en plasma controlando la cantidad de oxígeno que tenemos en la sangre (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012).

El gen *Epo* contiene un elemento de respuesta a la hipoxia en su extremo 3' (*hypoxia responsive element, HRE*) el cual une al factor de transcripción inducible por hipoxia HIF. Se han identificado tres familias de HIF: HIF1, HIF2, HIF3 que producen una serie de respuestas adaptativas a la hipoxia entre las que destacan la estimulación de formación de vasos (mediante VEGF), cambios metabólicos (por ejemplo activación de enzimas metabólicas) y aumento de expresión del receptor de la transferrina, entre otros (Bates & Ekem, 2015). Los HIF son heterodímeros compuestos por una subunidad β que se expresa constitutivamente (también conocida como traslocador nuclear de receptores de hidrocarburos arillo, ARNT) y una subunidad α regulada por la concentración de oxígeno (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012).

En condiciones normóxicas la subunidad α es degradada, por una familia de hidroxilasas (PHD1, PHD2 y PHD3) que promueven el reclutamiento de la proteína supresora de tumores Hippel Lindau, preparando los HIF para la degradación en los proteosomas (Bates & Ekem, 2015). En condiciones de hipoxia, HIF- α es traslocado al núcleo y dimeriza con HIF- β para posteriormente unirse a los sitios de unión hipóxicos HBS. Estos son lugares de secuencias CGTG, muy conservadas filogenéticamente presentes dentro de HRE, en conjunto, todos regulados por la concentración de oxígeno en sangre (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012).

Concluyendo, el aumento de los niveles del heterodímero HIF eleva la transcripción del gen EPO, aumentando los niveles séricos de la proteína. La unión de la EPO a los receptores de la eritropoyetina (EPO-R) resulta en la transducción de señales al núcleo, estimulando así la producción de glóbulos rojos (Bates & Ekem, 2015). Poco después de la estimulación del receptor por su ligando, los mecanismos para la regulación negativa de estas vías de señalización también se activan, devolviendo las proteínas de señalización a sus niveles basales. Este proceso es crucial para prevenir la hiperestimulación y, en consecuencia, la desregulación de la maquinaria celular (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012).

3.3.5. TPO

Se sabe que c-MPL y su ligando, la trombopoyetina (TPO), regulan la megacariopoyesis. El receptor c-MPL se expresa principalmente en las células madre hematopoyéticas, en menor medida en los progenitores megacariocíticos. (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012). TPO inicia la transducción de la señal al unirse al receptor c-MPL, que se asocia con la tirosina quinasa citoplasmática Janus quinasa 2 (JAK2) a través de su dominio de caja 1. En el estado no ligado c-Mpl existe como un homodímero, y la unión de TPO da como resultado un cambio conformacional que acerca las colas citoplasmáticas del receptor. En consecuencia, las moléculas de JAK2 asociadas con el receptor se acercan lo

suficiente entre sí para activarse. JAK2 luego se fosforila a sí mismo en múltiples residuos y fosforila c-Mpl en al menos Tyr 625 y Tyr 630. Estos residuos de fosfotirosina proporcionan sitios de acoplamiento para proteínas de señalización estimulando así la cascada de STAT, PI3K, MAPK y ERK 1 y 2 (Chotinantakul & Leeanansaksiri, 2012).

3.4. PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEMATOPOYÉTICA

3.4.1. Vía JAK / STAT

La vía JAK-STAT representa la vía principal para la transmisión de la señal del receptor de citoquinas al DNA, responsable de los efectos reguladores en el crecimiento, el desarrollo y la señalización hematopoyética (Ferrao et al., 2018). La unión de la citoquina a su receptor conduce a la dimerización del receptor y la activación subsiguiente de JAK. Los receptores son fosforilados por JAK en residuos de tirosina específicos, y a continuación, STAT se transloca al núcleo y activa genes uniéndose a sitios diana en sus promotores (Vainchenker & Kralovics, 2017).

La familia JAK de mamíferos consta de cuatro miembros: JAK 1, JAK 2, JAK 3 y tirosina quinasa 2 (TYK2). Están constitutivamente unidos intracelularmente, a los receptores de citoquinas hematopoyéticas mencionados en el apartado anterior (Ferrao et al., 2018) (ver apartado 3.3.).

Los receptores homodiméricos como el receptor de eritropoyetina (EPOR), MPL y el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSFR) usan JAK2, mientras que los receptores heterodiméricos usan JAK1 y JAK2 / tirosina quinasa 2 (TYK2) o JAK3 (Vainchenker & Kralovics, 2017).

Los JAK comparten una estructura conservada de cuatro dominios. La mitad C-terminal, contiene los dominios JH1 y JH2 (Figura 3). JH1 se comporta como una tirosín quinasa con actividad catalítica que está constantemente activada. JH2, en cambio, es una pseudoquinasa estructuralmente similar a JH1 pero que carece de actividad catalítica (Grabek et al., 2020). El dominio JH2 es requerido para dos funciones distintas en la señalización por citoquinas: para la inhibición de la actividad basal de JAK2 y para la activación de la señalización inducida por citoquinas. Se ha propuesto que el dominio JH2 contribuye a la formación de complejos JAK-receptor en respuesta al ligando, donde JH2 actúa como un switch que regula la transducción de señales (Mendiola Valle & Soto Cruz, 2005).

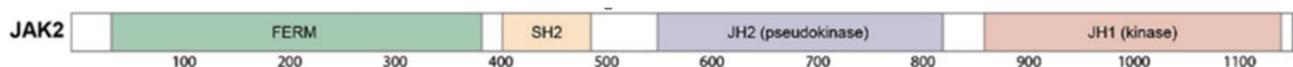


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la proteína JAK2. Modificada de (Jang & Choi, 2020).

La señalización de JAK por tanto, ocurre gracias a la activación constitutiva del dominio JH1 que experimenta fosforilación, y se libera de la inhibición de la actividad JH2 (Grabek et al., 2020). En el extremo N terminal, existen dos tipos

de dominios llamados FERM y SH2, responsables de la interacción con los distintos receptores (Vainchenker & Kralovics, 2017) (ver Figura 3). El dominio FERM está a su vez compuesto por tres subdominios, incluyendo un pliegue similar a la ubiquitina (F1), un dominio similar a la proteína de unión del CoA del acil (F2), y un pliegue similar a la homología del plextrino (PH) (F3). Estos tres dominios forman una estructura entrelazada similar a una hoja de trébol y están estrechamente asociados con el dominio SH2 para formar un holodominio de unión de receptores (Ferraio et al., 2018).

JAK2 se considera el miembro prototípico de la familia JAK (Kickler, 2005). El gen JAK2 (Janus Kinase 2) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9 en el locus p24.1, evolutivamente muy conservado que funciona como tirosina quinasa. Se activa a través de una variedad de receptores, como los de eritropoyetina (EPOR), trombopoyetina (TPOR) y factor estimulante de colonias de granulocitos/ macrófagos (GM-CSFR) que regulan la producción de los linajes eritroide, megacariocítico y granulocítico, respectivamente (Grinfeld et al., 2017) (Figura 4). Cuando son estimulados por ligandos, los receptores se dimerizan y acercan las quinasas JAK2. JAK2 se autofosforila e induce la fosforilación de la porción citoplásmica del receptor y los factores posteriores que participan en la proliferación, diferenciación y resistencia de la célula a la apoptosis (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021). Tiene así un papel esencial en la señalización de citoquinas e interferones involucrados en el crecimiento, hematopoyesis (GMCSF, EPO, TPO, IL-3), la inmunidad y la alergia (IL-12, IL-23, IL-5), y las respuestas antivirales (IFN γ).

La ablación con JAK2 en ratones da lugar a una letalidad embrionaria debida a la interrupción de la eritropoyesis en el útero, lo que explica la necesidad crítica de la señalización con JAK2 en el desarrollo del sistema hematopoyético. Por otra parte, JAK2 es también un protooncogen (ver apartado 6.1.) pues la sustitución de valina por fenilalanina en la posición del aminoácido 617 (V617F) en el exón 14 de JAK2, se ha demostrado que impulsan un subconjunto de trastornos mieloproliferativos, que se detallarán en apartados posteriores.

La familia STAT está compuesta por siete miembros de la familia: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B Y STAT6. Aunque las moléculas de STAT pueden ser activadas por una variedad de citoquinas, poseen sin embargo especificidad de citoquinas. Por ejemplo, STAT1 es activado por IFN α / β , y STAT6 es activado por IL-4 e IL-13 (Vainchenker & Kralovics, 2017). La eritropoyetina, puede activar STAT1, STAT3 y STAT5, pero el patrón clásico de activación de los eritrocitos es la vía JAK2/STAT5. Dicha activación, conduce, posteriormente a la transcripción de genes antiapoptóticos, como Bcl2 y Bcl-X_L, entre otros muchos genes. JAK2 también puede activar otras vías de señalización, como PI3/AKT y MAPK (ver Figura 4) favoreciendo la supervivencia celular (Vainchenker & Kralovics, 2017).

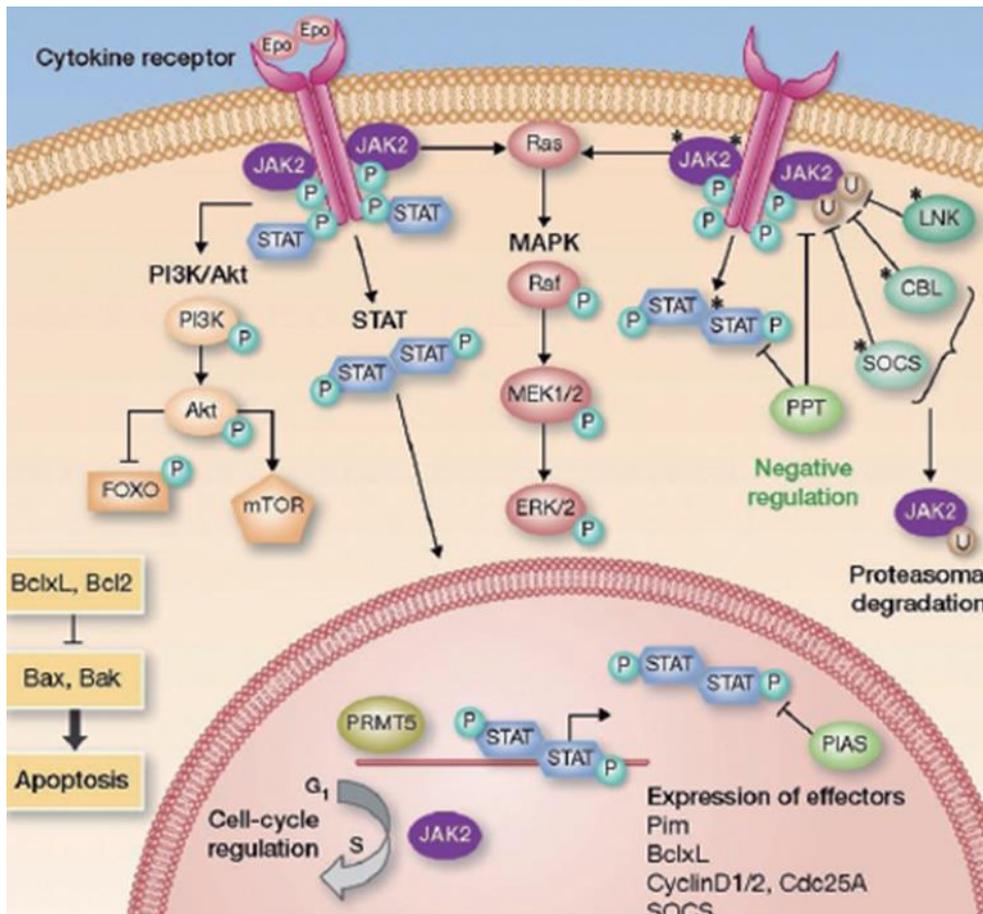


Figura 4. Visión general de la señalización molecular por JAK2. La unión de los ligandos a los receptores de citoquinas de la superficie celular inicia la autofosforilación de JAK2 y la fosforilación de las tirosinas de los receptores citoplasmáticos. Los STATs se unen a los receptores a través de los dominios SH2 y se traslocan al núcleo para inducir la expresión de genes efectoros como Pim quinasa anti-apoptótica y BclxL, ciclinas que promueven la progresión del ciclo celular. JAK2 también activa PI3K/Akt y MAPK, vías que promueven la proliferación y la supervivencia. Los reguladores negativos SOCS y CBL marcan JAK2 para su degradación por parte de los proteasomas, LNK secuestra JAK2 por unión directa, y la proteína tirosina fosfatasas (PTP) defosforila JAK y STAT. Los factores de transcripción se muestran en azul y reguladores negativos en verde (Jones, 2014).

El supresor de la señalización de citoquinas (SOCS) es un regulador negativo de la vía JAK / STAT. Por ejemplo, SOCS1 y SOCS3 compiten con las proteínas STAT por la unión del receptor de citoquinas, promoviendo la degradación de JAK2 a través del proteasoma (Figura 4). JAK2 es también regulado negativamente por las proteínas CBL, que actúan como ubiquitina ligasas, y por la proteína adaptadora LNK que secuestra JAK2. También las proteínas tirosin fosfatasas intervienen en el control de la señalización de JAK2, evitando la unión de STAT con el ADN diana (Jones, 2014). Más allá de la activación de las cascadas de señalización citoplasmáticas, recientemente se ha descrito que JAK2 puede traslocarse al núcleo produciendo un impacto directo en el estado de la cromatina (Jones, 2014).

3.4.2. Vía RAS/MAPK/ERK

La familia RAS consta de proteínas de bajo peso molecular con actividad GTPasa intrínseca. En los seres humanos, el gen Ras codifica cuatro proteínas distintas de 21 kDa: HRas, NRas, Kras4A y Kras4B. El estado de activación de

RAS depende de su asociación con GTP o GDP; cuando están unidos con GTP, están activos y pueden interactuar con otros efectores posteriores. Por el contrario, cuando se unen a GDP, están inactivos y no se unen a otras proteínas. En condiciones fisiológicas, estas interacciones están reguladas por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) y las proteínas activadoras de GTPasa. GEF y GAP regulan la activación de RAS al promover el intercambio de GDP por GTP y la hidrólisis de GTP, respectivamente. Las mutaciones en los genes RAS promueven la proliferación, la supervivencia y la migración de las células además de la angiogénesis tumoral a través de la activación de numerosas vías de señalización que eventualmente conducen a una regulación positiva de factores proangiogénicos como el VEGF (Tripathi & Carson, 2014). JAK2 activado, por tanto, induce a la activación de la vía RAS el cual fosforila ERK, una serina treonina quinasa que activa múltiples proteínas tanto en el citoplasma como en el núcleo. ERK es un regulador clave de una amplia variedad de vías de señalización, por lo que su desregulación podría interrumpir múltiples procesos. En el citoplasma, ERK contribuye al transporte de iones, apoptosis y regulación del metabolismo, entre otros. En el núcleo, se dirige a los reguladores del ciclo celular y a múltiples factores de transcripción (Gujarro-hernández & Vizmanos, 2021).

3.4.3. Vía PI3-K/AKT

La vía de la PI3-K está implicada en la señalización de IL-6, Epo, GM-CSF, G-CSF y M-CSF. (Bates & Ekem, 2015). Cataliza la fosforilación del 3'OH en el fosfatidilinositol en la membrana plasmática afectando el crecimiento celular, la supervivencia, la migración y el metabolismo celular (Bates & Ekem, 2015). AKT es una quinasa de supervivencia celular que inhibe la apoptosis mediante la fosforilación de la proteína proapoptótica BAD y el factor de transcripción FOXO3A. Además, AKT puede activar una amplia gama de mecanismos como la traducción de proteínas a través de mTOR o la maquinaria del ciclo celular (Gujarro-hernández & Vizmanos, 2021). Varias proteínas de señalización que incluyen serina, treonina quinasa y proteína de unión a G tienen dominios que se unen específicamente a fosfoinositoles fosforilados. En las células en reposo, estas proteínas se localizan en el citoplasma, pero se trasladan a la membrana plasmática en respuesta a la fosforilación de lípidos. Estas proteínas activadas pueden iniciar una variedad de procesos celulares, como la polimerización de actina y el ensamblaje de complejos de señalización (Jang & Choi, 2020).

3.4.4. Vía CSF3R/G-CSF

El receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF3) es esencial para la maduración granulocítica. El dominio extracelular, es importante para la proliferación de los neutrófilos y su región citoplasmática, regula la diferenciación y función granulocítica. Además, puede funcionar en algunos eventos de adhesión o reconocimiento en la superficie celular (Jang & Choi, 2020).

Como se puede deducir, es fundamental un correcto control de todas estas vías que activan la hematopoyesis, pues de no ser así, existiría una sobreproducción de células sanguíneas al activarse constitutivamente vías fisiológicas de transducción de señales, hecho que ocurre, por ejemplo, en las neoplasias mieloproliferativas (MPN) (Cross, 2019).

4. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Las neoplasias mieloproliferativas (MPN) son trastornos hematológicos clonales que conducen a la sobreproducción de células derivadas del linaje mielóide (Grabek et al., 2020). Incluyen varias enfermedades muy heterogéneas clínicamente, pero todas comparten su origen de una célula progenitora hematopoyética multipotencial. Mantienen además, una sobreproducción de uno o más elementos formes de la sangre sin displasia significativa y existe una predilección por la hematopoyesis extramedular, la mielofibrosis y una tasa variable de transformación en leucemia aguda (Kasper et al., 2016).

Dentro de las neoplasias mieloproliferativas destacan, por un lado, la leucemia mielóide crónica, leucemia neutrófila crónica y la leucemia eosinofílica crónica, que expresan un fenotipo mielóide y, por otro lado, la policitemia vera (PV, *polycytemia vera*), la mielofibrosis primaria (PMF, *primary myelofibrosis*) y la trombocitosis esencial (ET, *essential thrombocytosis*), los cuales pueden transformarse entre sí (Kasper et al., 2016).

Las mutaciones impulsoras específicas dentro de las células madre y los progenitores mieloides (como mutaciones en JAK, PI3-K o RAS), proporcionan señales proliferativas independientes de citoquinas que conducen a la sobreproducción de células mieloides (Grabek et al., 2020). Adicionalmente pueden aparecer otras mutaciones, predominantemente en genes reguladores epigenéticos, procesamiento de ARN y reguladores transcripcionales que serán un sello distintivo de la evaluación diagnóstica, pronóstica y terapéutica en pacientes con MPN. Además, otros factores genéticos, como la predisposición de la línea germinal, el orden de adquisición de la mutación y la frecuencia de las variantes alélicas, también influyen en el inicio y la progresión de la enfermedad (Jang & Choi, 2020).

Los estudios de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) han proporcionado información clave sobre los mecanismos moleculares de las MPN además, ha contribuido sustancialmente a nuestra comprensión de la patogénesis de la enfermedad, destacando el papel de la evolución clonal en la progresión de la enfermedad (Jang & Choi, 2020). Además, el pronóstico de la enfermedad se ha expandido, de abarcar sólo la toma de decisiones clínicas, a incluir la genómica en los sistemas de puntuación de pronóstico. Teniendo en cuenta la disminución de los costes y el aumento de la velocidad y la disponibilidad de las tecnologías de alto rendimiento, se está alcanzando la integración de NGS en el proceso de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas enfermedades (Skov, 2020).

4.1. PRINCIPALES NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

A los efectos de esta revisión, nos centraremos en los MPN más comunes de PV, ET y PMF, también llamadas neoplasias mieloproliferativas cromosoma Filadelfia negativas, y que comparten mutaciones impulsoras similares (*Next Generation Sequencing in MPNs . Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors Of*, 2020). En concreto, centraremos el estudio en la Policitemia vera, la neoplasia mieloproliferativa más frecuente como veremos a continuación.

El “International Working Group for MPN Research and Treatment” (IWG-MRT), definió y actualizó los criterios diagnósticos para clasificar, aquellas mielofibrosis que se desarrollaban *de novo* (mielofibrosis primarias) y aquellas secundarias a PV y ET (post-PV-MF y post-ET-MF). Dicha actualización surgió de la necesidad de diferenciar aquellos pacientes con mielofibrosis temprana o *de novo*, que presentaban una mayor agresividad y una supervivencia global reducida en comparación con ET primaria. Las tasas de progresión fibrótica de ET y PV, durante un intervalo de tiempo similar, se estiman del 4% al 11% y del 6% al 14%, respectivamente (Loscocco et al., 2020) (ver tablas en el Anexo: criterios diagnósticos de la OMS).

Toda MPN puede transformarse en leucemia mieloide aguda secundaria, conocida como fase blástica de la MPN, que generalmente es refractaria a la quimioterapia convencional y tiene un pronóstico desfavorable. Por ejemplo, el riesgo de leucemia a los 15 años, se estima en 2,1% a 5,3% para ET, 5,5% a 18,7% para PV y más del 20% para PMF (Loscocco et al., 2020).

- La PV se caracteriza por una producción elevada de glóbulos rojos que incluye un aumento de la concentración de hemoglobina, aumento del hematocrito y / o aumento de la masa de glóbulos rojos. Además, es frecuente encontrar hiperplasia variable de los linajes megacariocíticos y granulocíticos. La gran mayoría porta una mutación de Janus Kinase 2 , JAK2V617F, con un subconjunto menos frecuente que tiene una mutación del exón 12 de JAK2.
- La ET se caracteriza por trombocitosis sostenida y aumento del número de megacariocitos. No se dispone de ningún marcador clonal para distinguir de manera constante la ET de otras variantes no clonales reactivas y más frecuentes de trombocitosis, lo que dificulta su diagnóstico. No hay síntomas o signos específicos en la ET, los pacientes pueden tener tendencias hemorrágicas y trombóticas que se manifiestan en el primer caso como facilidad para la formación de equimosis y, en el segundo, como oclusiones microvasculares, eritromelalgia o isquemias cerebrales transitorias. Algo importantes es que la trombocitemia esencial, puede evolucionar y transformarse PV o PMF después de varios años, lo cual revela la naturaleza real de la MPN subyacente. Existe sobreexpresión suficiente de la carga del alelo JAK2V617F en los neutrófilos de la ET y la PV, de tal manera que no puede utilizarse como característica diagnóstica específica; solo la cuantificación de la masa eritrocítica y el volumen plasmático permiten distinguir entre la PV y la ET. Por lo tanto, una vez que se determinan la masa eritrocítica y el volumen plasmático, es relevante observar que 64% de los pacientes con diagnóstico de ET y positividad para JAK2V617F cursa en realidad con PV (Kasper et al., 2016).
- La mielofibrosis es un trastorno más heterogéneo, tanto por sus características clínicas como biológicas, caracterizado por la proliferación de megacariocitos y granulocitos anormales, con depósito de tejido fibrótico en la médula ósea. No hay signos o síntomas específicos en la mielofibrosis primaria (PMF). Muchos pacientes se encuentran asintomáticos y la enfermedad se detecta casi siempre por la identificación de esplenomegalia, resultados anormales en la biometría

hemática o ambos, durante una valoración común. Sin embargo, a diferencia de las MPN relacionadas, algunos signos frecuentes son sudoración nocturna, fatiga y pérdida de peso. Un frotis sanguíneo revela las características típicas de la hematopoyesis extramedular: dacriocitos, eritrocitos nucleados, mielocitos y promielocitos; también pueden observarse mieloblastos (Kasper et al., 2016). Las células mieloides proliferan inicialmente en la médula ósea y luego se expanden a sitios extramedulares como el bazo, produciendo hematopoyesis extramedular (Vainchenker & Kralovics, 2017).

4.2. MUTACIONES EN MPN

Las neoplasias mieloproliferativas están asociadas a mutaciones directoras en los genes JAK2, CALR y MPL que conducen a una activación constitutiva de la señalización JAK-STAT, independiente de la regulación de citoquinas. Además, la mayoría de los pacientes tienen mutaciones concomitantes en genes implicados en la metilación del ADN, la modificación de la cromatina, el empalme del ARN mensajero, la regulación de la transcripción y la transducción de señales (Loscocco et al., 2020).

Estas mutaciones adicionales pueden surgir antes, en el contexto de la denominada "hematopoyesis clonal de potencial indeterminado" (CHIP), o después de la adquisición de la mutación conductora. El fenotipo clínico de MPN resulta de interacciones complejas entre mutaciones y factores del hospedador. La aplicación cada vez mayor de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) ha ampliado el conocimiento del panorama mutacional y ha contribuido a definir la importancia clínica de las mutaciones (Loscocco et al., 2020).

4.3. MUTACIONES CONDUCTORAS: FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN

La activación constitutiva de la vía JAK-STAT es el sello distintivo de MPN. Las mutaciones en JAK2, CALR y MPL se denominan "mutaciones impulsoras", en función de su papel en el impulso del fenotipo MPN y son cruciales para el diagnóstico junto con las características clínicas e histopatológicas. Estas tres mutaciones son mutuamente excluyentes, pero se han informado tanto casos de coexistencia, como pacientes con características de MPN pero sin ninguna de estas mutaciones clasificándose estos últimos como "triple negativo" (Skov, 2020).

Por ejemplo, el espectro de mutación impulsora de la trombocitemia esencial, es más diverso que en la policitemia vera, con proporciones aproximadamente similares de pacientes portadores de mutaciones activadoras JAK2, MPL y

CALR, lo que también ocurre en la mielofibrosis primaria (Bose & Verstovsek, 2019). Además, no todas las mutaciones son iguales pues, por ejemplo, las mutaciones en JAK2 y MPL ocurren como mutaciones puntuales de ganancia de función (como por ejemplo, JAK2V617F y MPLW515L), mientras que las mutaciones en CALR ocurren como cambios de marco de +1 par de bases en el último exón codificante de CALR, lo que resulta en la generación de un nuevo C-terminal (Mead & Mullally, 2017) (Figura 5).

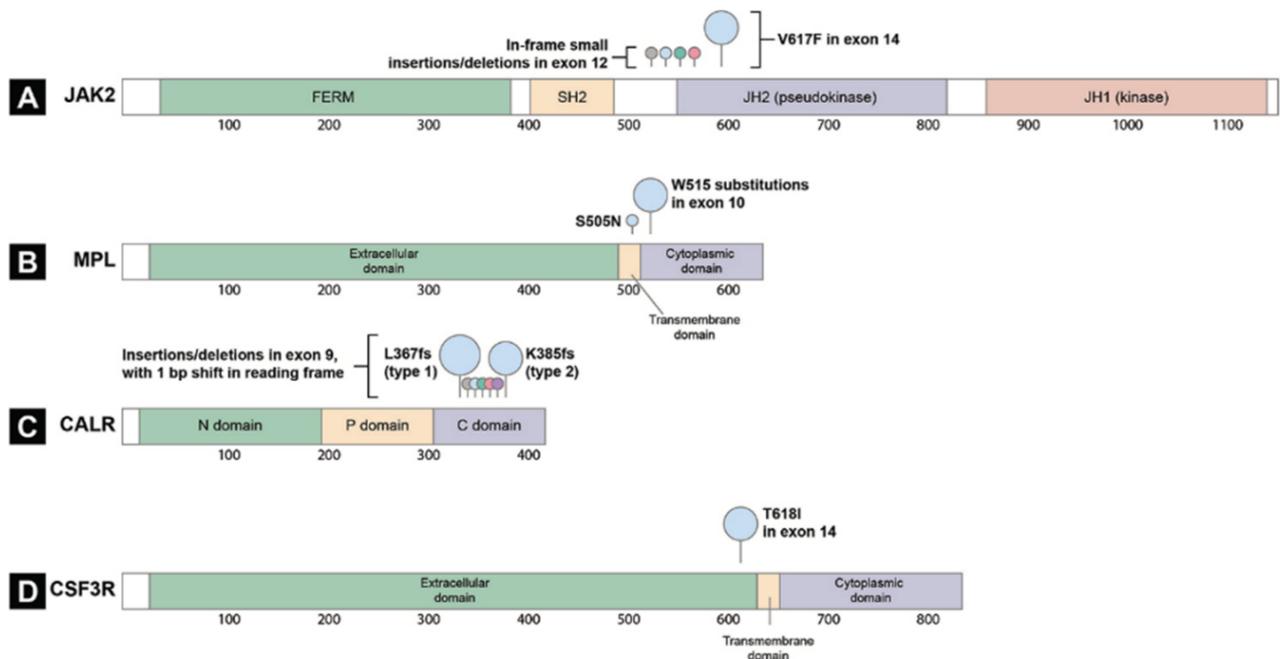


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la proteína y la ubicación de la mutación. (A) JAK2, (B) MPL, (C) CALR y (D) CSF3R. El tamaño del círculo corresponde a la frecuencia de mutación (Jang & Choi, 2020).

En las MPN se describieron dos tipos de mutaciones en JAK2. En primer lugar, en 2005 se identificó la sustitución de valina por fenilalanina en la posición del aminoácido 617 (V617F) en el exón 14 (Figura 5A). JAK2V617F es una mutación de ganancia de función y está presente en la mayoría de los pacientes con MPN, incluido aproximadamente el 98% de los pacientes con PV y el 50-60% de los pacientes con ET o PMF (Loscocco et al., 2020) (Skov, 2020). En segundo lugar, en 2007 se descubrieron diversas mutaciones, particularmente inserciones o deleciones en el exón 12 de JAK2; consideradas extremadamente raras y que se encuentran exclusivamente en 2 a 3% de todos los pacientes con PV negativos para JAK2V617F (Loscocco et al., 2020).

CALR codifica la calreticulina, una proteína chaperona de 46 kDa ubicada en la luz del retículo endoplásmico, que tiene un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y el plegamiento de proteínas. Las mutaciones CALR son la segunda mutación más común en pacientes con MPN (después de JAK2 V617F) y se encuentran en el 20 al 25% de los casos de ET y del 25 al 30% de los casos de PMF (rara vez se encuentra en PV) (Jang & Choi, 2020). Hasta la fecha, se han descrito más de 50 mutaciones CALR diferentes, todas en el exón 9, 80% de las cuales son mutaciones de tipo 1 o tipo 2 (Figura 5C). La mutación de tipo 1 es una deleción

de 52 pb (c.1092_1143del, p.L367fs * 46), mientras que la mutación de tipo 2 es una inserción de 5 pb (c.1154_1155insTTGTC, p.K385fs * 47). La distribución de estos tipos de mutación CALR varía según el subtipo de MPN. Los mutantes de tipo 1 son más frecuentes, asociándose con un fenotipo de mielofibrosis y un riesgo significativamente mayor de transformación mielofibrótica en la ET. Por el contrario, los mutantes de tipo 2 se asocian con un fenotipo ET, un riesgo de trombosis bajo (a pesar de un recuento de plaquetas más elevado) y una evolución clínica indolente (Jang & Choi, 2020) (ver Figura 5). CALR, por tanto, en comparación con el mutante JAK2, se asocia con recuentos de plaquetas más altos y de hemoglobina y leucocitos más bajos.

El papel de CALR mutado en relación con el fenotipo clínico de MPN aún no se ha aclarado completamente, pero diversos estudios apuntan que CALR mutante se une a MPL dentro del retículo endoplásmico lo que resulta en la activación constitutiva de MPL y, en consecuencia, de la señalización JAK-STAT (Jang & Choi, 2020). Las mutaciones en MPL, receptor de la superficie celular de TPO, explican en gran medida la trombocitosis marcada en pacientes con ET y PMF. Dicho receptor regula la megacariopoyesis y la producción de plaquetas a través de la señalización JAK-STAT y también se expresa en las células madre hematopoyéticas. Se han descrito mutaciones en el exón 10 de MPL (Figura 5B) siendo las más comunes mutaciones de ganancia de función W515L y W515K (Loscocco et al., 2020). Por lo tanto, las mutaciones CALR y MPL casi siempre están asociadas con un fenotipo ET o MF, pero no con un fenotipo PV, puesto que la activación de esas vías en las células madre pluripotentes de la médula ósea, promueve en la megacariopoyesis y un fenotipo de trombocitosis (Mead & Mullally, 2017).

Recientemente, se han encontrado mutaciones en CSF3R relacionadas con la leucemia neutrofílica crónica (CNL). Este gen, codifica el receptor G-CSFR por lo que su mutación, conduce a la activación constitutiva de dicho receptor, promoviendo así la proliferación de neutrófilos maduros (Jang & Choi, 2020). La mutación más común, CSF3R T618I (Figura 5D) es una mutación activadora en la región proximal de la membrana que da como resultado la dimerización del receptor independiente de la unión del ligando y la activación constitutiva de la vía JAK-STAT (Jang & Choi, 2020). El diagnóstico diferencial de la leucemia neutrofílica crónica y la leucemia mieloide crónica atípica a menudo es un desafío puesto que ambas presentan una superposición de características clínicas como leucocitosis, esplenomegalia y diátesis hemorrágica. Por tanto, el reciente descubrimiento de mutaciones en CSF3R resulta un gran avance para el diagnóstico diferencial de estos trastornos. La mutación activadora de CSF3R T618I se encuentra en más del 80% de los pacientes con CNL, pero está ausente en los pacientes con leucemia mieloide crónica. En 2017, las directrices de la Organización Mundial de la Salud incluyó las mutaciones en CSF3R como uno de los criterios de diagnóstico de la CLN (Jang & Choi, 2020).

La razón por la que podemos encontrar la mutación JAK2V617F en policitemia vera, trombocitemia esencial o mielofibrosis primaria, es que es capaz de activar los 3 principales receptores de citoquinas (receptor de eritropoyetina, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y MPL) (ver Figura 6). En cambio, CALR y MPL, están restringidos a la activación de MPL, por lo que sus mutaciones las encontraríamos en la trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria (Vainchenker & Kralovics, 2017). A pesar de que se hayan descritos casos de coexistencia, en general se trata de mutaciones excluyentes (Figura 6) (Jang & Choi, 2020).

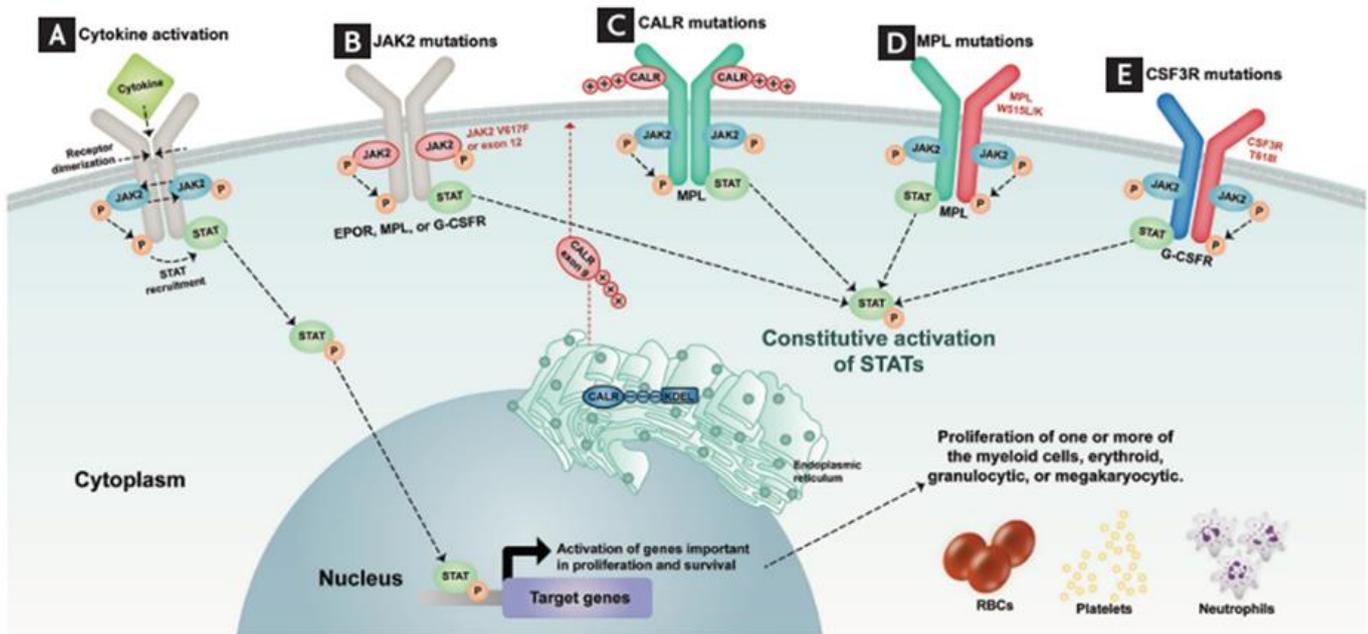


Figura 6. Mecanismo general de activación de citoquinas de la vía JAK-STAT. La unión del receptor conduce a la dimerización de las subunidades del receptor, lo que induce la transfosforilación de las JAK. Las JAK activadas fosforilan los receptores, que posteriormente son reconocidos por las STAT. Los STAT son fosforilados por JAK y transportados al núcleo, donde regulan la transcripción de sus genes diana. Las mutaciones impulsoras somáticas clave para el desarrollo de neoplasias mieloproliferativas ocurren en (B) JAK2, (C) CALR, (D) MPL y (E) CSF3R, todos los cuales están asociados con la activación de la vía JAK-STAT (Jang & Choi, 2020).

Por otra parte, aquellos pacientes con características de MPN sin ninguna de estas mutaciones se clasifican como “triple negativo” (Loscocco et al., 2020). Se han descrito en aproximadamente 10% de los casos de ET y del 5 al 10% de los casos de mielofibrosis. La evaluación diagnóstica típica de estos pacientes implica el análisis del exón 14 de JAK2, el exón 10 de MPL y el exón 9 de CALR para detectar la presencia de mutaciones somáticas (Jang & Choi, 2020). Un pequeño número de pacientes, tras tiempo del diagnóstico, puede adquirir mutaciones en JAK2, lo que puede reflejar la expansión clonal de una mutación de carga muy baja o un falso negativo en la prueba inicial (Loscocco et al., 2020). Cuando no se encuentran mutaciones en dichos genes, el estudio se amplía y se suelen encontrar “mutaciones no canónicas”. Por ejemplo, dentro de MPL, se incluyen mutaciones T119I, S204F / P y E230G en el dominio

extracelular e Y591D / N en el dominio intracelular. En JAK2, se pueden encontrar mutaciones no canónicas V625F, F556V, R683G y E627A. Como se demostró en estudios funcionales, la mayoría de estas variantes raras conducen a la activación constitutiva de la señalización JAK-STAT (Loscocco et al., 2020).

4.4. MUTACIONES EN GENES ADICIONALES

Los análisis de secuenciación masiva NGS han descubierto un número notable de mutaciones somáticas adicionales con relevancia pronóstica y terapéutica (Loscocco et al., 2020) (Figura 7). Están presentes en el 50% de los pacientes con MPN que no se limitan solamente a las neoplasias mieloproliferativas, pues también están presentes en la leucemia mieloide aguda (AML), los síndromes mielodisplásicos (MDS) así como en algunos pacientes ancianos sin una enfermedad mieloide manifiesta, siendo más frecuentes en los pacientes de edad avanzada (Jang & Choi, 2020).

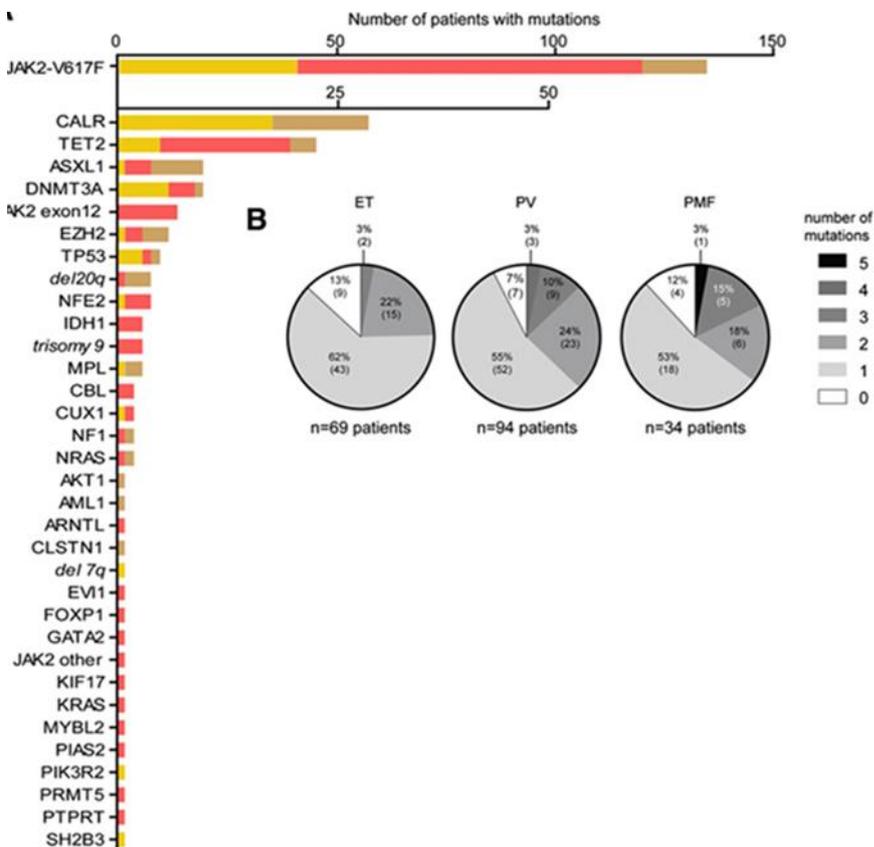


Figura 7. Frecuencia y distribución de las mutaciones en pacientes con MPN. (A) Gráfico de barras que muestra el número de pacientes con mutaciones en los genes indicados. Los pacientes de ET son representados en amarillo, los pacientes de PV en rojo, y los pacientes con mielofibrosis en marrón claro. (B) Gráfico de tarta con la distribución de mutaciones somáticas entre 197 pacientes del con MPN según el fenotipo. Los tonos de gris indican el número de mutaciones somáticas por paciente. Modificada de (Lundberg et al., 2014).

Se trata de mutaciones coexistentes en modificadores de cromatina, componentes del complejo de espliceosomas, modificadores de metilación del ADN, supresores de tumores y reguladores de la transcripción cuyo número total está inversamente relacionado con la supervivencia y el riesgo de transformación leucémica. En cambio, confieren nuevos puntos de oportunidad terapéutica (Grabek et al., 2020). Cabe destacar que no son mutuamente excluyentes, pues pueden ocurrir dos o más mutaciones simultáneamente (Jang & Choi, 2020). Aunque no impulsan directamente la proliferación clonal, sin embargo influyen en el curso y la progresión de la enfermedad y, por tanto, contribuyen a la heterogeneidad de la MPN (Lanikova et al., 2019). En un estudio realizado sobre la frecuencia y distribución de las mutaciones en pacientes con MPN (Lundberg et al., 2014), destacaron que después de JAK2V617F y CALR, las mutaciones más frecuentemente observadas fueron en genes reguladores epigenéticos como TET2, ASXL1, DNMT3A y EZH2, así como en reguladores transcripcionales, incluyendo el supresor tumoral TP53 (Figura 7). En apartados posteriores se detallará el papel de estas mutaciones en las MPN.

5. POLICITEMIA VERA

A continuación, centraremos este trabajo en el estudio más detallado de la policitemia vera, siempre en comparación con las otras neoplasias mieloproliferativas. Profundizaremos en diversos aspectos de la enfermedad: las manifestaciones clínicas, las alteraciones moleculares subyacentes y cómo el conocimiento de estas alteraciones está permitiendo predecir el pronóstico de los pacientes y dirigir la terapia mediante el desarrollo de fármacos dirigidos contra dichas alteraciones moleculares.

La policitemia vera, junto con la trombocitemia esencial y la mielofibrosis, pertenece a las llamadas "clásicas" neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1-negativas, un grupo heterogéneo de enfermedades, caracterizado por la expansión clonal de una célula madre hematopoyética (Iurlo et al., 2020).

5.1. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que su incidencia anual es de 2,3 a 2,8 por cada 100.000 personas/año en poblaciones como en Europa y América del Norte (reportándose las menores tasas en Israel y Japón) (Iurlo et al., 2020). La edad media del diagnóstico está en torno a los 60 años siendo muy raro el diagnóstico antes de los 20. Existe además un discreto predominio masculino, así como una mayor tendencia a presentarse a una edad inferior en dicho grupo (Iurlo et al., 2020). Dada la importante heterogeneidad clínica entre los pacientes con PV, algunos tienen una esperanza de vida normal y otros desarrollan complicaciones potencialmente mortales, con una mediana de supervivencia alrededor de 14 años (Loscocco et al., 2020).

La PV no se considera una enfermedad hereditaria, aunque se han descrito familias con predisposición genética a presentar la enfermedad. En estudios de asociación del genoma realizados en pacientes con policitemia vera, se ha visto asociación entre el haplotipo 46/1 y la aparición de JAK2 V617F. Se trata de una región de 280 Kb de largo del cromosoma 9p que incluye tres genes en su totalidad: el gen JAK2, insulina like 4 (INSL4) e insulina like 6 (INSL6). Dicho

haplotipo es más propenso a la mutación JAK2V617F y mutación del exón 12. Sin embargo, una posibilidad más probable es que la aparición de JAK2 mutante en el contexto del haplotipo JAK2 46/1 confiera una ventaja clonal o fenotípica adicional (Lanikova et al., 2019).

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 la relación con radiaciones ionizantes, así como con la exposición a determinados tóxicos (Loscocco et al., 2020).

5.2. PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON PV

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 (Cuthbert & Stein, 2019). El curso de la enfermedad es variable, siendo muchos de los diagnósticos causales en analíticas sanguíneas rutinarias. En los casos sintomáticos, éstos derivan de principalmente de recuentos elevados de glóbulos rojos, que dan como resultado un aumento de la viscosidad de la sangre, y de recuentos elevados de plaquetas, que pueden contribuir a la formación de trombos (Lengfelder et al., 2006).

El fenotipo clínico de MPN resulta de interacciones complejas entre mutaciones y factores del hospedador. De esta manera, por ejemplo, los hombres suelen presentar tasas más altas de trombocitemia, necesidades de transfusión y una duración más corta de la enfermedad, mientras que las mujeres suelen experimentar síntomas más graves y frecuentes, particularmente síntomas abdominales y microvasculares (Cuthbert & Stein, 2019). Además, la edad avanzada, típicamente definida como ≥ 60 años, es un factor de riesgo bien establecido para la progresión de la enfermedad. Diversos estudios afirman que la mediana del número de años hasta la progresión de la enfermedad es estadísticamente mayor entre los pacientes más jóvenes en comparación con la cohorte de ancianos (Cuthbert & Stein, 2019).

5.2.1. SÍNTOMAS GENERALES

Son frecuentes los síntomas inespecíficos, como astenia, cefalea, pérdida de peso, sudoración y prurito. Esto se debe, en parte, a que la mutación JAK2 V617F provoca un exceso de citoquinas que promueve la inflamación sistémica. Los pacientes con PV, presentan mayor tasa de IL-1, IL-7, IFN- α e IFN- γ y VEGF, en comparación por ejemplo con los pacientes con ET los cuales presentan niveles relativamente bajos de marcadores inflamatorios.

El prurito, concretamente, ocurre en un cuarto de los pacientes pudiendo ser a menudo la primera manifestación de la enfermedad (se ha visto que el 65% de todos los pacientes experimentan síntomas en promedio 2,9 años antes del diagnóstico) y pudiendo llegar a ser severo en algunos casos. Es característico el prurito acuagénico, es decir, precipitado por baños calientes y puede asociarse con el eritema, hinchazón o dolor, más intenso en el pecho, la espalda, el lado medial de los brazos y las piernas (Cuthbert & Stein, 2019). El mecanismo exacto por el cual se desarrolla el prurito no se comprende, aunque diversos estudios

afirman que la basofilia, el exceso de histamina y el déficit de hierro podrían estar relacionados, ya que suele aliviarse controlando el hematocrito (Cuthbert & Stein, 2019).

5.2.2. COMPLICACIONES MICROVASCULARES

Los síntomas microvasculares como consecuencia de un aumento de viscosidad de la sangre e hipersensibilidad plaquetaria, son comunes en la PV. Incluyen cefalea, alteraciones visuales, mareos, entumecimiento, disminución de la concentración, alteraciones del estado de ánimo y problemas de sexualidad. Es de destacar que los pacientes con PV experimentan dolores de cabeza y problemas de concentración más graves en comparación con las cohortes con ET y MF.

La eritromelalgia es una complicación vasomotora de la PV que se manifiesta como calor, eritema y dolor ardiente en las extremidades. Además, los pacientes experimentan con frecuencia parestesias en las manos y pies cuya clínica mejora con el frío. Aunque la patogenia no se comprende completamente, se cree que está parcialmente mediada por hipersensibilidad plaquetaria (Cuthbert & Stein, 2019). En 1985, Michiels et al estudiaron la fisiopatología de la eritromelalgia mediante biopsias cutáneas, destacando la inflamación arteriolar, proliferación fibromuscular y oclusiones trombóticas. Su equipo describió la resolución del dolor y la reversión de las complicaciones microvasculares con aspirina e indometacina, pero no con otros agentes terapéuticos, destacando así el importante papel de la inflamación mediada por plaquetas y la oclusión microcirculatoria en la patogenia de la eritromelalgia (Cuthbert & Stein, 2019).

5.2.3. TROMBOSIS

La trombosis es la complicación grave más común en los pacientes con PV, pudiendo ser arterial (y llevar a infartos de miocardio o infartos cerebrales), venosa o microvascular (Iurlo et al., 2020).

La incidencia global de trombosis arterial y venosa es significativamente mayor entre los pacientes mayores (edad > 65 años) o en aquellos con antecedentes de trombosis previa. Además, los factores de riesgo cardiovascular, en particular, la hipertensión, el tabaquismo y la leucocitosis, aunque todavía no están incluidos formalmente en un sistema de puntuación de riesgo, contribuyen, a aumentar el riesgo global de trombosis arteriales. Por el contrario, un cariotipo anormal y trombosis venosas previas se ha visto que se correlacionan más con un mayor riesgo de complicaciones venosas (Iurlo et al., 2020). Como consecuencia, los pacientes con PV están actualmente estratificados en dos clases de riesgo trombótico: un grupo de bajo riesgo, en el caso de pacientes más jóvenes (edad <60 años) sin trombosis previa, y un grupo de alto riesgo, en el caso de pacientes mayores de 60 años y / o con complicaciones trombóticas previas (Iurlo et al., 2020).

En la circulación venosa, suelen ser frecuentes los trombos en sitios inusuales como en vasos mesentéricos, esplénicos y trombos hepato-portales. Los datos indican que la propensión a la trombosis venosa en sitios atípicos está correlacionada con la presencia de la mutación JAK2 V617F. La trombosis de la vena esplénica, por ejemplo, se encuentra a menudo a la vez que JAK2V617F, incluso en pacientes sin PV (Mackman, 2018).

Los glóbulos rojos, expresan el receptor de muerte FasR. La activación de FasR en los glóbulos rojos conduce a una pérdida de la asimetría de la membrana y a la exposición de fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina, en la superficie celular. Por otra parte, las plaquetas, expresan FasL. Se ha demostrado que las plaquetas inducen la exposición a fosfatidilserina en los glóbulos rojos a través de una interacción entre FasL en las plaquetas y FasR en los glóbulos rojos. Dicha interacción ligando / receptor promueve el ensamblaje de complejos de factores de coagulación que conducen a la generación de trombina y la formación de trombos oclusivos (Mackman, 2018) (ver Figura 8).

Recientemente, el grupo de Guy et al., 2019 investigaron el papel de las células endoteliales que expresan JAK2 V617F en la formación de trombos. Usaron ratones modificados genéticamente que expresaban JAK2 en sus células endoteliales, pero no en células hematopoyéticas y demostraron que tenían predilección por desarrollar eventos trombóticos a pesar de tener recuentos sanguíneos normales y tasas normales de generación de trombina. Observaron que tenían un fenotipo pro-adhesivo asociado con un aumento de la exposición endotelial de P-selectina, secundario a la desgranulación de los cuerpos de Weibel-Palade (éstos son gránulos de almacenamiento que poseen las células del endotelio y que almacenan principalmente factor de von Willebrand y la P-selectina) (Figura 8). Todo esto provoca una mayor propensión a los trombos y al estudiar sus células endoteliales, observaron que la regulación incrementada de la P-selectina se atribuye al aumento de la fosforilación de STAT3 que es un evento “aguas abajo” de la señalización de JAK / STAT (Cuthbert & Stein, 2019).

La P-selectina ha sido implicada también en la progresión a mielofibrosis pues conduce a una mayor liberación de las proteasas de los neutrófilos y del factor de crecimiento transformante beta, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de fibrosis de la médula ósea, osteosclerosis y progresión de la enfermedad (Bar-Natan & Hoffman, 2019).

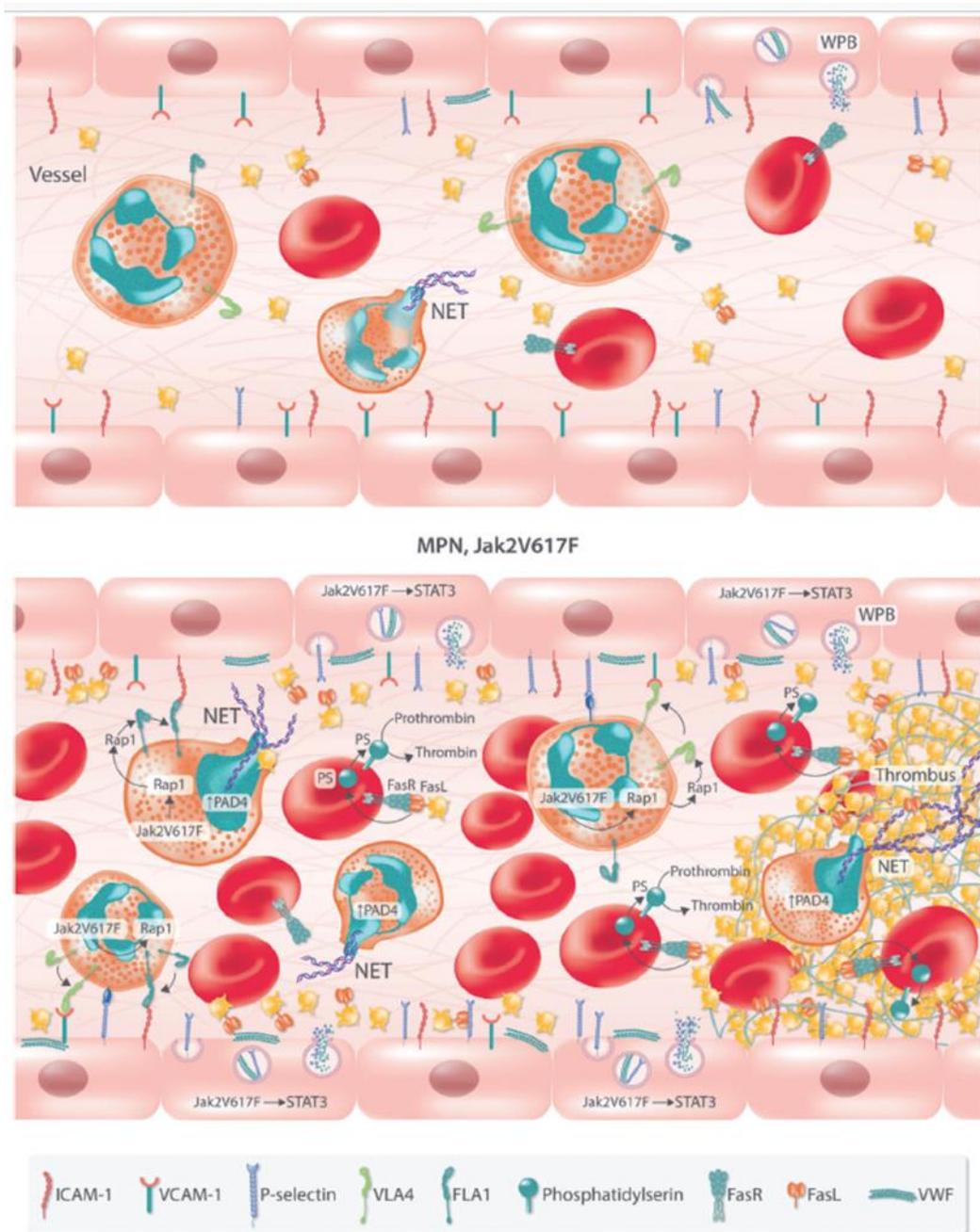


Figura 8. Mecanismo de la formación de trombos. La mutación *Jak2V617F* provoca un aumento en la desgranulación del cuerpo de Weibel-Palade (WPB) de las células endoteliales de la P-selectina y el factor von Willebrand (VWF); translocación de Rap1 hacia la membrana celular con activación de las integrinas LFA1 y VLA4; y aumento de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Además, una interacción entre glóbulos rojos y plaquetas a través de FasL / FasR provoca la externalización de la fosfatidilserina (PS). Todos estos eventos juegan un papel en la formación de trombos (Bar-Natan & Hoffman, 2019)

5.2.4. OTRAS MANIFESTACIONES

El aumento del hematocrito genera un enlentecimiento del flujo sanguíneo pudiendo ocasionar diversas manifestaciones neurológicas como cefalea, somnolencia, insomnio, amnesia, tinnitus, vértigo o depresión. La hipertensión es probablemente más común en los pacientes con PV, al igual que la hiperuricemia. Se estima que la esplenomegalia afecta del 30 al 40% de los

pacientes con PV y generalmente se asocia con una enfermedad avanzada. Además, se ha demostrado se asocia significativamente con un mayor riesgo de transformación fibrótica y / o evolución leucémica (Iurlo et al., 2020).

5.3. EVOLUCIÓN NATURAL DE LA PV

Tradicionalmente se pensaba que la PV progresaba en serie desde la eritrocitosis hasta la mielofibrosis y la transformación leucémica, pero su presentación y progresión pueden variar enormemente como consecuencia de variables como la edad de presentación, el sexo o la genética. Además, existen formas indolentes y agresivas de la enfermedad siendo estas últimas objeto de estudios recientes que sugieren que la acumulación de mutaciones deletéreas podría identificar a pacientes en riesgo de transformación de la enfermedad (Spivak, 2019). Los MPN son dinámicos y están sujetos a transformaciones entre ellos debido a mutaciones de genes directores compartidos. Por ejemplo, la ET positiva para JAK2 V617F puede transformarse en PV, hecho que ocurre más a menudo en mujeres y, de la misma manera, la PV transformarse en mielofibrosis.

5.3.1. PROGRESIÓN A FIBROSIS

La evolución fibrótica a MF destaca como una importante transformación de la enfermedad con impactos significativos en la morbilidad y mortalidad entre los pacientes con PV. Durante un período de 20 años ocurre la llamada “mielofibrosis post-PV” (PPMF) en el 26% de las PV (Grabek et al., 2020). Un recuento de leucocitos $\geq 15 \times 10^9 / L$ en el momento del diagnóstico de PV se considera un factor de riesgo significativo para el desarrollo de mielofibrosis post PV. Además, una vez diagnosticada con MF, una leucocitosis mayor de $30 \times 10^9 / L$ es un predictor útil de disminución de la supervivencia. Aun así, desafortunadamente no hay pruebas de que el control de la leucocitosis pueda prevenir la progresión (Cuthbert & Stein, 2019).

Se ha demostrado, además, en todas las neoplasias mieloproliferativas, independientemente del subtipo y la mutación impulsora, existe una activación de vías de señalización inflamatorias. Por ejemplo, las HSC positivas para JAK2V617F son capaces que producir de manera aberrante citoquinas proinflamatorias en la médula, como, IL-1b, TFG β y el TNF α . Todo esto, a la larga conduce a una reducción en el número de células madre mesenquimales y una aceleración de la progresión de la neoplasia mieloproliferativa, culminando en fibrosis medular (Mead & Mullally, 2017). Según los criterios de consenso del “International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment” (IWG-MRT), el diagnóstico de mielofobrosis post-PV requiere un grado de fibrosis de médula ósea ≥ 2 (escala de 3 puntos) o ≥ 3 (escala de 4 puntos), además de dos características clínicas como anemia, esplenomegalia, síntomas constitucionales, necesidad de flebotomía y / o terapia citorreductora, o un frotis leucoeritroblástico (Cuthbert & Stein, 2019).

5.3.2. TRANSFORMACIÓN LEUCÉMICA

El acontecimiento más grave de la PV es la transformación en leucemia aguda, con una incidencia durante un período de 20 años del 8 al 17% (Grabek et al., 2020). Es más frecuente durante la mielofibrosis post-PV, espontáneamente o

asociado con la quimioterapia o la irradiación (como el uso de fósforo-32 y agentes alquilantes como clorambucilo y pipobroman). Ni la expresión de JAK2 V617F ni su frecuencia alélica variante se correlacionan con la transformación leucémica, los cambios genómicos o la supervivencia (Spivak, 2019). En cambio, sí que se han asociado varias mutaciones con la evolución leucémica, entre ellas en los genes ASXL1, TP53, SRSF2, IDH1/2 y RUNX1 (Cuthbert & Stein, 2019), que se describirán más adelante.

6. MUTACIONES CONDUCTORAS EN LA PV

Varias líneas de evidencia apoyan el concepto de que la célula diana original que adquiere la mutación iniciadora de MPN es una célula madre hematopoyética; inmunofenotípicamente definida como CD34⁺ CD38⁻. A partir de aquí, la mutación se encuentra en todos los linajes de células maduras (Mead & Mullally, 2017). El desarrollo fenotípico de la enfermedad, además, requiere la existencia de una ventaja selectiva de las células madre, donde ocurrirá la hematopoyesis clonal (Mead & Mullally, 2017).

6.1. Mutación JAK2V617F

La mutación somática más frecuente de JAK2 ocurre como consecuencia de un cambio de una base G a T en el nucleótido 1849 en el exón 14 del dominio pseudoquinasa JH2, lo que da como resultado una sustitución de aminoácidos de valina por fenilalanina en el codón 617 (Grabek et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, el dominio pseudoquinasa de JAK2, en condiciones normales, tiene 2 funciones: inhibir el dominio quinasa y promover la activación dependiente de citoquinas. V617F activa JAK2 mediante un mecanismo que no se comprende completamente, pero los datos estructurales y funcionales han establecido que el primer cambio conformacional inducido por V617F involucra la hélice C del dominio pseudoquinasa (Vainchenker & Kralovics, 2017). De esta manera, JAK2V617F reduce la función autoinhibidora del dominio JH2 y conduce a la activación constitutiva de la quinasa. Como consecuencia, se produce una hipersensibilidad a las citoquinas, y el receptor se activa independientemente de la unión de ligando (Grinfeld et al., 2017). Además, la mutación V617F puede permitir el escape de la regulación negativa por parte del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) (Grinfeld et al., 2017).

Nuestras células, son diploides, por lo que contienen 2 copias del genoma, cada una de ellas procede de un progenitor. La posesión de 2 alelos idénticos en una posición determinada se denomina homocigosidad, si los alelos son diferentes se nombra como heterocigosidad. La pérdida de heterocigosidad puede definirse como el fenómeno por el cual un locus pierde una de las copias de un gen, por delección u otro mecanismo, siendo esto lo que ocurre en los pacientes con PV (Kasper et al., 2016). Más de 95% de los pacientes con PV expresa esta mutación y, con el transcurso del tiempo, una pequeña proporción de las personas con PV con heterocigosidad JAK2 V617F adquiere homocigosidad por recombinación mitótica (esto último ocurre rara vez, tras 10 años de evolución de la enfermedad) (Kasper et al., 2016).

Otro evento molecular común en la Policitemia Vera es la disomía uniparental adquirida (aUPD). Se refiere a la situación en la que ambas copias de un

cromosoma, o de parte de un cromosoma, se heredan de un cromosoma de un solo progenitor, en lugar de una copia que proviene de la madre y el padre. Dicho fenómeno no solo puede ocurrir como una lesión de la línea germinal (UPD constitucional) sino que también puede adquirirse en células somáticas, lo que se conoce como UPD adquirida (aUPD). La primera observación de aUPD fue realizada por Kralovics y Prchal en 2002 en la Policitemia Vera, y se ha demostrado que es la aberración cromosómica más común en las neoplasias mieloproliferativas (MPN) (Wang et al., 2016). Se cree que el 9p aUPD es un evento genético posterior que ocurre después de la adquisición de JAK2 V617F para proporcionar una ventaja de crecimiento a las células y hacer que JAK2 V617F sea homocigoto. Sin embargo, recientemente se ha reconocido que 9p aUPD puede ocurrir antes de JAK2 V617F (Wang et al., 2016). Es decir, 9p aUPD en sí mismo puede tener una ventaja competitiva independiente (ya sea debido a la selección de un haplotipo de JAK2 particular o alteraciones en otros genes en el cromosoma 9p) que no está relacionada con la dosis de JAK2V617F (Grinfeld et al., 2017).

La mutación JAK2V617F surge en un progenitor hematopoyético multipotente, por lo que puede impulsar todos los fenotipos de las diferentes neoplasias mieloproliferativas a través de la activación independiente de ligandos de receptores para eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), lo que resulta en la expansión de linajes eritroides, megacariocíticos y granulocíticos, respectivamente (Loscocco et al., 2020). Además, también puede estar presente en el linaje linfoide, especialmente en células B y NK y más raramente en células T, estando ausente en células no hematopoyéticas (Vainchenker & Kralovics, 2017).

Un trabajo reciente utilizando modelos de ratones transgénicos con la mutación JAK2V617F plantearon la cuestión de si JAK2V617F es capaz de iniciar MPN o si son necesarias mutaciones adicionales para el inicio de la enfermedad (Mead & Mullally, 2017). Demostró que, el inicio de MPN se puede lograr a partir de un solo HSC que expresa JAK2V617F, y que lo más probable es que no se requieran otros eventos genéticos para la inducción de un fenotipo de MPN completo. En cambio, observaron y que la adquisición de JAK2 V617F no da como resultado invariablemente MPN (Grinfeld et al., 2017). Estudios realizados con xenoinjertos de células de pacientes con mutaciones en JAK2 han demostrado que la mutación JAK2V617F por sí sola, no confiere una fuerte ventaja de autorenovación. En cambio, dichas células mutantes sí que están sesgadas hacia una diferenciación simétrica con una expansión posterior del grupo progenitor. Estas observaciones han llevado a la sugerencia de que JAK2V617F solo, es insuficiente para iniciar la enfermedad pero que se requieren mutaciones adicionales.

La cuestión de si la presencia de JAK2V617F inicia las MPN también se ha planteado con frecuencia, ya que se ha encontrado dicha mutación en la sangre periférica de individuos sin enfermedad hematológica aparente (Lanikova et al., 2019). Este fenómeno, se ha denominado hematopoyesis clonal de potencial indeterminado ("clonal hematopoiesis of indeterminate potencial", CHIP) y está fuertemente asociado con el aumento de la edad (Mead & Mullally, 2017). Curiosamente, estos individuos muestran una carga alélica muy baja, tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y algún riesgo (pero no inevitable) de progresión de la MPN (Lanikova et al., 2019).

JAK2V617F se encuentra entre las mutaciones asociadas a CHIP más comunes y, en la mayoría de los casos, las mutaciones de JAK2 son eventos aislados que ocurren en ausencia de otras mutaciones hematológicas asociadas a malignidad, lo que sugiere que JAK2V617F solo es suficiente para provocar hematopoyesis clonal, pero insuficiente para inducir la neoplasia mieloproliferativa. Parece ser necesario un umbral mínimo de carga del alelo JAK2V617F para el desarrollo de una enfermedad manifiesta (Mead & Mullally, 2017).

6.2. MUTACIONES EN EL EXÓN 12 de JAK2

En 2007 se describió que, en aquellos casos de PV en los que no se detectaba la mutación JAK2V617F, podían presentar mutaciones en el exón 12 de JAK2. Dichas mutaciones no se localizan en un nucleótido concreto, como es el caso de la mutación V617F, si no que se trata de inserciones o deleciones que pueden afectar a diferentes nucleótidos que se encontraban aproximadamente a 80 aminoácidos antes de V617. Se observan en el 1% al 2% de los pacientes con PV (Jang & Choi, 2020).

Las mutaciones afectan a los residuos entre K537 y E543. Se encuentran corriente arriba del dominio JH2 y producen un aumento de la fosforilación de JAK2 (en comparación con las mutaciones JAK2V617F) que resulta en la activación independiente de las citoquinas del dominio JH1 (Jang & Choi, 2020). A diferencia de JAK2V617F, las mutaciones en el exón 12 solo están presentes en mutaciones heterocigotas. Además, no se asocian generalmente a trombocitemia esencial ni a mielofibrosis primaria, pero, JAK2 exón 12, sí que puede progresar a mielofibrosis secundaria (Vainchenker & Kralovics, 2017).

Los pacientes con mutaciones en el exón 12 activan predominantemente el receptor de EPO y muestran niveles más altos de JAK2 y STAT5. Como consecuencia, mantienen una eritrocitosis más marcada con valores de hemoglobina más altos y una leucocitosis y trombocitosis más baja. Todo ello hace que los pacientes presenten una edad más temprana en el momento del diagnóstico. Todo esto sugiere que el aumento del JAK2 promueve el fenotipo policitémico (Jang & Choi, 2020). 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 JAK2V617K (Vainchenker & Kralovics, 2017).

6.3. CONSECUENCIAS MUTACIONALES

Se han propuesto varias explicaciones posibles para intentar comprender el por qué una mutación de JAK2V617F adquirida por una sola HSC puede resultar en una variedad de fenotipos clínicos tan amplios (PV, ET y fenotipos de MF).

La primera hipótesis defiende la correlación entre el fenotipo y la proporción de alelos con la mutación JAK2, ya que varias líneas de evidencia sugieren que el aumento de la señalización de JAK2 conduce a un fenotipo más policitémico (Grinfeld et al., 2017). Por ejemplo, existe una carga de alelos mutados más baja en la trombocitemia esencial en comparación con la policitemia vera (Grinfeld et al., 2017). Un aumento aún mayor de carga de alelos se ha correlacionado con la progresión a mielofibrosis, lo que es consistente con observaciones de mayor

carga de alelos en pacientes con MF en comparación con PV y ET (Grabek et al., 2020). La segunda hipótesis hace referencia a la relación entre el equilibrio de STAT1, STAT3 y STAT5. Por ejemplo, el aumento de la actividad STAT1 en progenitores hematopoyéticos produce un fenotipo tipo trombocitemia esencial, aumenta la trombocitosis, acelera la fibrosis y disminuye la supervivencia global, mientras que una regulación a la baja de la actividad STAT1 produce un fenotipo similar a la PV (Lanikova et al., 2019). Esto ocurre porque STAT1 favorece niveles más altos de IFN γ que limita la diferenciación eritroide y aumenta la proliferación de megacariocitos (Grabek et al., 2020).

Cuando aparecen las mutaciones en el exón 12 o la mutación JAK2V617F en líneas celulares dependientes de citoquinas (como la IL3), se produce una hipersensibilidad a dichas citoquinas o una independencia de las mismas. A bajos niveles de expresión de JAK2V617F, por ejemplo, es necesaria tanto la presencia de citoquinas como los receptores EPOR. En cambio, a mayor nivel de expresión JAK2V617F, mayor independencia de las mismas (Vainchenker & Kralovics, 2017). Como consecuencia, se produce una señalización anormal de las vías MAPK, PI3K-AKT y STAT lo que conlleva una mayor activación de genes de proliferación y genes pro-supervivencia como Bcl-XL (Grabek et al., 2020). Además, como se explica en el apartado 6, se ha visto que la hiperactivación de la vía JAK-STAT puede tener consecuencias directas sobre la cromatina, actuando sobre las histonas e impidiendo su capacidad para regular ciertos genes (Vainchenker & Kralovics, 2017).

7. MUTACIONES SOMATICAS ADICIONALES

Las mutaciones conductoras somáticas mencionadas en JAK2, MPL, CALR y CSF3R no pueden explicar completamente la heterogeneidad de las MPN en general y de la policitemia vera en particular (Jang & Choi, 2020). Se describen como mutaciones coexistentes ya que su presencia dentro de un clon puede preceder a la adquisición de la mutación conductora o puede ocurrir después de la mutación (Grabek et al., 2020). Existe además una conciencia cada vez mayor de que mutaciones somáticas adicionales no conductoras pueden contribuir al pronóstico de la PV, afectando a la supervivencia general libre de leucemia y libre de mielofibrosis (Cuthbert & Stein, 2019). En general, las variantes mutacionales adversas se asocian con una supervivencia inferior, impulsando algunas a la progresión a mielofibrosis y otras a la transformación leucémica (Tefferi et al., 2016). Tefferi et al describieron la presencia de tales mutaciones adicionales y sus implicaciones pronósticas. Utilizando un panel de 27 genes relevantes para la neoplasia mieloide, identificaron que un 53% de los pacientes con PV presentaban variantes distintas de las mutaciones conductoras tradicionales, siendo TET2 y ASXL1 las más comunes (Tefferi et al., 2016).

En la Figura 9 se resumen las principales mutaciones encontradas en genes modificadores de la cromatina, complejo del espliceosoma, supresores tumorales y reguladores transcripcionales, que se detallan a continuación.

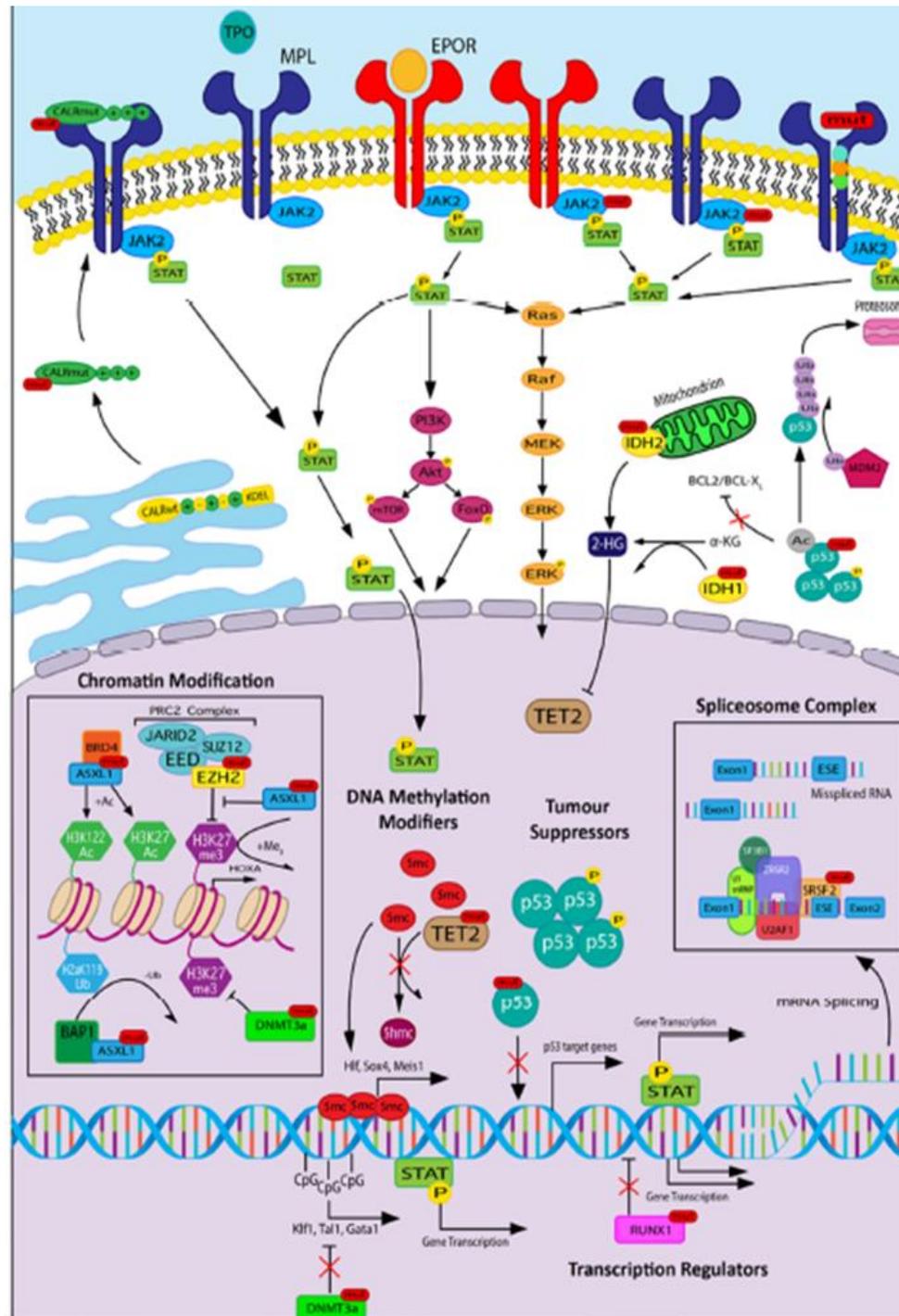


Figura 9. Vías de señalización molecular implicadas en MPN. Receptores de la superficie celular son el receptor de eritropoyetina (EPOR; rojo), receptor de trombopoyetina / MPL (azul marino), MPL con calreticulina mutada (CALR), MPL de tipo salvaje sin ligando (trombopoyetina (TPO) unido y sin señalización STAT. EPOR de tipo salvaje con ligando unido (eritropoyetina (EPO) que conduce a señalización STAT, EPOR con mutante JAK2, MPL con mutante JAK2 y MPL mutada. El citoplasma muestra la señalización de la vía STAT con activación de las vías PI3K / Akt y RAS, y el núcleo muestra los efectos de las mutaciones coexistentes en las funciones nucleares. Se indican los modificadores de metilación del ADN, los supresores de tumores, los reguladores de la transcripción, complejo del espliceosoma y modificaciones de la cromatina alterados en las MPN (Grabek et al., 2020).

7.1. MUTACIONES EN REGULADORES EPIGENÉTICOS

La palabra "epigenética" significa "además de cambios en la secuencia genética", englobando cualquier proceso que altere la actividad genética sin cambiar la secuencia del ADN, y conduce a modificaciones que pueden transmitirse a las células hijas. Se han identificado muchos tipos de procesos epigenéticos, entre ellos, los más frecuentes son la metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitilación de las histonas y la metilación del ADN (Weinhold, 2006).

En las células eucariotas el ADN está enrollado alrededor de un octámero de histonas, dos moléculas de cada una de las histonas H3, H4, H2A y H2B, para formar el nucleosoma, la unidad primaria que conforma la cromatina. Los nucleosomas compactan el genoma y restringen el acceso y reconocimiento del ADN a los factores de transcripción, de tal manera que existe un balance entre un empaquetamiento efectivo del genoma y la accesibilidad a proteínas reguladoras. A esta regulación contribuyen, entre otras, la actividad de enzimas modificadoras de histonas como las proteínas histona acetiltransferasa (HAT), las proteínas histona metiltransferasa (HMT), las proteínas histona desacetilasa (HDAC) y las proteínas ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) (Sauvageau & Sauvageau, 2010).

Las histonas, por lo tanto, sufren modificaciones postraduccionales que "encienden" o "apagan" su función biológica. Las proteínas histona metiltransferasa (HMT) son las que nos atañen principalmente en la presente revisión ya que algunas, junto con la proteína ASXL2, forman parte del complejo Polycomb (PcG) (Sauvageau & Sauvageau, 2010). Las proteínas Polycomb están presentes en la mayoría de los organismos multicelulares y se han identificado más de 15 proteínas PcG diferentes que forman parte de complejos multiproteicos distintos. Se trata de proteínas necesarias para el silenciamiento epigenético a largo plazo de la cromatina; además, tienen un papel importante en la diferenciación de las células madre y el desarrollo embrionario temprano (Vainchenker & Kralovics, 2017). Por lo tanto, junto con el complejo represor polycomb, ASXL1 induce la metilación de histonas, lo que conduce al silenciamiento de ciertos genes, como los genes homeóticos (HOX) u otros propios del desarrollo que deben permanecer inactivos (Grabek et al., 2020).

7.1.1. ASXL1

Las mutaciones en ASXL1 son la segunda mutación reguladora epigenética más común en MPN después de TET2 y ocurren en aproximadamente el 25% de los casos de (Jang & Choi, 2020). Dichas mutaciones ocurren en el extremo 5' del exón 12, principalmente como mutaciones de desplazamiento del marco de lectura o, con menos frecuencia, mutaciones sin sentido, resultando en la ganancia de función en algunas vías celulares y a una pérdida de función en otras (Grabek et al., 2020). Los miembros de la familia ASXL comparten una arquitectura de dominio común altamente conservado (ASXH) en la región N-terminal y un homeodominio vegetal (PHD) en la región C-terminal. Dichos dominios reconocen diferentes subtipos de histonas como H2AK119ub y H3K27.

El ASXL normal tiene efectos tanto de silenciamiento como de activación en la expresión génica. Por un lado, interacciona con una proteína asociada BARCA1

(BAP1), un supresor tumoral crítico en tumores sólidos. BAP1 a la vez, es un componente esencial del polycomb tipo 1, ya que desubiquitina la histona H2A en la lisina 119 (H2AK119ub) (Asada et al., 2018). Cuando se potencia la actividad ASXL1-BAP, de alguna manera se protege a la histona H2AK119 ya que evitan su ubiquitinación, y por lo tanto, su destrucción por el proteosoma (Grabek et al., 2020). De esa manera, la histona mantiene ciertos genes silenciados, como los genes HOXA, evitando su transcripción. Los genes HOXA son una familia de genes que se expresan en las células madre hematopoyéticas y participan en su diferenciación. Se expresan continuamente durante la fase proliferativa de la hematopoyesis y disminuyen su expresión cuando las células comienzan a diferenciarse. Por ejemplo, la proteína HOXA7 es requerida en la hematopoyesis de eritrocitos y megacariocitos (Vainchenker & Kralovics, 2017) (ver Figura 10A). Los mutantes ASXL1 y BAP1 ocurren en diversas neoplasias hematológicas, entre ellas PV y forman un complejo hiperactivo con una actividad incrementada que promueve la transformación mieloide, se potencia la actividad el complejo ASXL1 / BAP1 lo que provoca la expresión desregulada de genes HOXA en las células hematopoyéticas (Balasubramani et al., 2015) (Figura 10B).

Otra de las funciones de ASXL no mutado es inducir la metilación de las marcas de histonas a través del complejo represor polycomb 2 (PRC2) que conduce a la represión y el silenciamiento de genes de remodelación de la cromatina como HOXA. En dicho complejo participan proteínas como EZH2, EED y SUZ12, que promueven la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3). Los efectos de pérdida de función de la mutación ASXL1 están mediados por una pérdida de trimetilación de la histona H3 lisina 27 (H3K27) mediada por PRC2, lo que lleva a la pérdida de la represión del grupo de genes HOXA (Grabek et al., 2020) (Figura 10).

En las neoplasias mieloproliferativas además, junto con la pérdida de la trimetilación de H3K27, existe una regulación positiva de los genes que gobiernan la diferenciación mieloide. Este sesgo mieloide, se puede atribuir parcialmente a otra aberración que ocurre en ASXL1. ASXL1 mutante se une a BRD4, una proteína que pertenece a la familia BET (bromodomains and extra-terminal domain (BET)) (Jang & Choi, 2020). La familia de proteínas BET comprende BRD2, BRD3, BRD4 (expresada de forma ubicua) y BRDT y se caracterizan por la presencia de dos dominios bromodominios N -terminales conservados (BD1 y BD2) y un dominio C-terminal. La estructura del bromodominio contiene cuatro hélices alfa separadas por una región de bucle variable y juntas permiten la formación de una cavidad hidrofóbica que reconoce residuos de acetil-lisina (Hajmirza et al., 2018). Son 'lectores' de cromatina: al interactuar con lisinas acetiladas en las colas de histonas, reclutan proteínas cromatina para regular la expresión génica. La unión de ASXL1 mutante a BRD4, resulta en la acetilación de H3K27 lo que conduce, por una parte, a la regulación positiva de genes mieloides pero por otra parte, como se explica más adelante, también confiere mayor sensibilidad a los inhibidores de bromodominio BET (ver apartado 10.1).

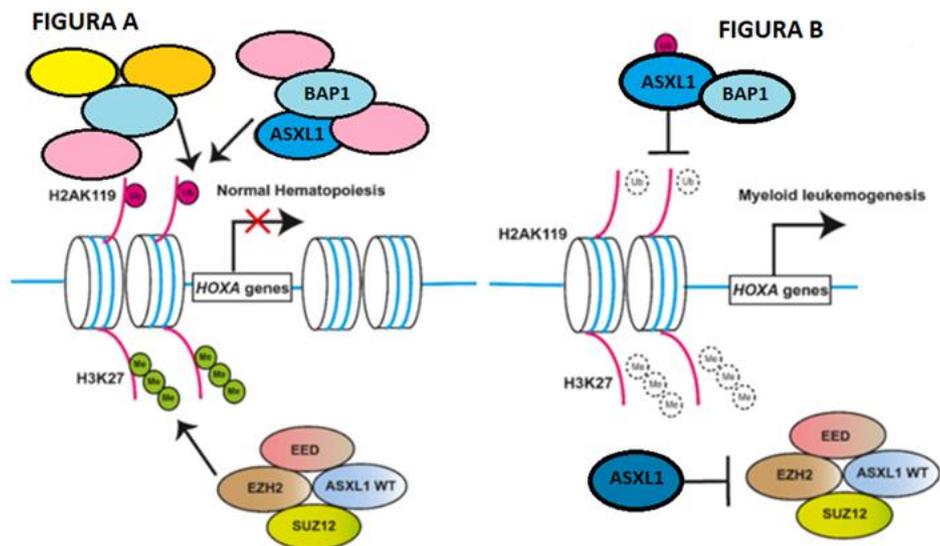


Figura 10. Representación esquemática de los complejos asociados a la histona H2AK119 y H3K27. A) representa lo que ocurre en condiciones normales. Por un lado, la actividad ASXL1-BAP evita la ubiquitinación de la histona H2AK119 y por otro, ASXL no mutado favorece la metilación de las marcas de histonas a través del complejo represor polycomb 2 (PRC2). Ambos hechos evitan la transcripción de los genes HOXA. B) representa lo que ocurre en situaciones patológicas como la PV. Por un lado, los mutantes ASXL1 y BAP1 forman un complejo hiperactivo, que elimina la ubiquitinación de H2AK119. Por otro, las mutaciones en ASXL1 provocan una pérdida de trimetilación de H3K27 promoviendo ambos acontecimientos la expresión de genes HOXA (Asada et al., 2018).

Por lo tanto, la expresión de la proteína mutante ASXL1 da como resultado una cromatina más abierta en las HSC y, por lo tanto, una expresión desregulada de genes críticos para la autorrenovación y diferenciación. Las mutaciones de ASXL1 se asocian con un mal pronóstico y una mayor frecuencia de transformación leucémica (Jang & Choi, 2020). Según la clasificación del “International Prognostic Scoring System” (iPSS), conducen a una citopenia profunda con una displasia asociada con un defecto en las propiedades de autorrenovación (Vainchenker & Kralovics, 2017). Cabe destacar, que en las neoplasias mieloproliferativas, las mutaciones ASXL1 no están asociadas a una sola mutación conductora, pudiendo aparecer junto con JAK2, CARL o MPL (Grabek et al., 2020).

7.1.2. EZH2

EZH2 codifica una histona metiltransferasa y forma parte del complejo PRC2 mencionado anteriormente. ASXL1 recluta el complejo PRC2 en loci específicos a través de una interacción directa entre ASXL1 y EZH2; lo que provoca, finalmente, la metilación del histona nucleosómica H3 en la lisina K27 (Grabek et al., 2020). La mayoría de las mutaciones de EZH2 en la enfermedad mieloide, en particular MPN, conllevan una pérdida de su función y modifica drásticamente el fenotipo de MPN. La pérdida de función de EZH2 da como resultado una des-represión de un conjunto de genes que incluye varios oncogenes, como por ejemplo HOXA9. Además, es uno de los causantes del cambio en el fenotipo de la enfermedad pues provoca una inhibición de la eritropoyesis y promoción de la megacariopoyesis, acelerando así el desarrollo de mielofibrosis (Jang & Choi, 2020). Por lo tanto, las

alteraciones genéticas en EZH2 se asocian con un pronóstico adverso y una disminución de la supervivencia general (Szybinski & Meyer, 2021).

En cuanto a los pacientes con policitemia vera, no se han identificado mutaciones EZH2, pero pacientes con mielofibrosis post-PV sí que han demostrado mutaciones EZH2 que significan un cambio fenotípico en PV que induce proliferación de megacariocitos y fibrosis (Grabek et al., 2020).

7.1.3. TET2 y DNMT3A

La metilación en el átomo de carbono 5 del nucleótido citosina (5-metil-citosina o 5-mC), es la modificación epigenética predominante del ADN. TET2 y DNMT3A son proteínas encargadas de regular dicho proceso. Las mutaciones en ambos reguladores aumentan la autorrenovación de las HSC JAK2 V617F y desempeñan un papel importante tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad (Jang & Choi, 2020).

El gen regulador epigenético más frecuentemente mutado en las MPN es un miembro de la familia TET; mutaciones con pérdida de función se encuentran en aproximadamente el 10% de las MPN. TET2, en condiciones normales, convierte la 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), iniciando así el proceso de desmetilación, necesario para la regulación génica en las células madre y el desarrollo embrionario (Grinfeld et al., 2017). El gen TET2 se expresa en gran medida en las células madre hematopoyéticas y en las células progenitoras, y se regula negativamente con la diferenciación. Una de las consecuencias de la mutación de TET2 por tanto, es un aumento en el porcentaje de células inmaduras (Solary et al., 2014). Todas las mutaciones de TET2 son mutaciones puntuales o deleciones con pérdida de función, por lo general en un alelo, y más raramente en ambos alelos somáticos (Grinfeld et al., 2017). En pacientes con mutación en TET2, se observa una reducción de 5-hmC lo que provoca un exceso de metilación del DNA (ver Figura 11). Esto genera un efecto particular sobre las HSC aumentando la expresión de genes de autorrenovación, sensibilizando las células hematopoyéticas a mutaciones cooperantes y sesgando hacia la diferenciación mielomonocítica (Grabek et al., 2020). Una posible explicación es que el compromiso del linaje está regulado por TET2, lo que sugiere un posible mecanismo por el cual las mutaciones de TET2 pueden resultar en un bloqueo de diferenciación mieloide.

Existe una hipótesis que defiende que el orden en que se adquieren las mutaciones somáticas influye en la selección de subclones hematopoyéticos, lo que, a su vez, tiene un impacto en el fenotipo de la enfermedad, riesgo trombótico, edad de presentación y respuesta al tratamiento. De esta manera, se ha visto que aquellos pacientes con una mutación simultánea en JAK2 y TET2 que adquirieron la mutación JAK2V617F antes que TET2 tienen mayor probabilidad de presentar PV que ET. Muestran así una mayor expansión de los progenitores eritroides a una edad más temprana y tienen además, mayor riesgo de trombosis (Grinfeld et al., 2017). Por el contrario, los pacientes con TET2 o DNMT3A primero, son más propensos a tener trombocitemia esencial (Jang & Choi, 2020). Cabe destacar, que TET2 se asocia más significativamente con formas familiares y esta variante, en combinación con 46/1 y otras variantes, tiene un efecto aditivo sobre la susceptibilidad a las neoplasias mieloproliferativas. La variante TET también

confiere una predisposición a la co-ocurrencia de tumores sólidos en pacientes con neoplasias mieloproliferativas (Cross, 2019).

DNMT3A es parte de la familia DNMT de enzimas responsables de la metilación del ADN en los dinucleótidos CpG (metilación de citosinas (5mC)). La mutación más común de DNMT3A en las neoplasias mieloides es la sustitución de histidina por arginina en la posición 882 (R882H), que altera su actividad enzimática. Los estudios en ratones indican que la DNMT3A mutante disminuye el reclutamiento de PRC2 en H3K27 favoreciendo la accesibilidad y la expresión génica persistente (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021). Las mutaciones DNMT3A son menos frecuentes que las mutaciones TET2 (5% -10%) (Grabek et al., 2020) y de forma similar a TET2, es más probable que los pacientes presenten PV cuando JAK2 V617F se adquiere antes de la mutación DNMT3A mientras que aquellos que adquirieron primero DNMT3A, presentan un fenotipo de ET (Loscocco et al., 2020).

Concluyendo, TET2 y DNMT3A pueden aumentar las capacidades de autorrenovación de las HSC jugando así un papel importante al inicio de la enfermedad. Además, a pesar de que no haya evidencia clara de que estas mutaciones induzcan inestabilidad genética, al inducir una hematopoyesis clonal y así aumentar la replicación de las células madre mutadas, pueden inducir indirectamente mutaciones secundarias. También pueden favorecer la leucemogénesis modificando progresivamente el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

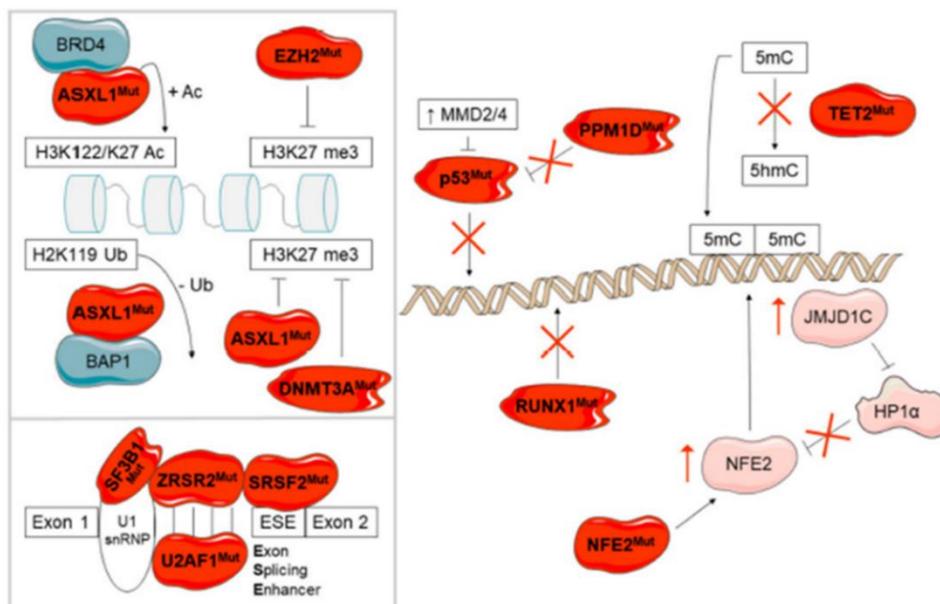


Figura 11. Descripción general de los genes modificadores de la enfermedad mutados en MPN y sus consecuencias moleculares. Estas mutaciones ocurren en genes que afectan la regulación epigenética (ASXL1, EZH2, DNMT3A, TET2), supresión tumoral (TP53 y PPM1D), regulación de la transcripción (RUNX1 y NFE2) y empalme (SRSF2, U2AF1, SF3B1 y ZRSR2) (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

7.2. MUTACIONES EN EL COMPLEJO DEL ESPLICEOSOMA

El espliceosoma es un complejo que se encuentra en el núcleo celular eucariota que está formado por ribonucleoproteínas capaces de eliminar intrones de los precursores de ARNm, formando parte del complejo del “splicing” de RNA. Los factores de empalme también mutan de forma recurrente en MPN y hasta aproximadamente el 20% de los pacientes con PMF albergan alteraciones genéticas en SRSF2, U2AF1, SF3B1 o ZRSR2 que provocan un empalme incorrecto (Figura 11) (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

SRSF2 es fundamental para el ensamblaje de espliceosomas. Contiene el motivo de unión de ARN de tipo ribonucleoproteína y el dominio carboxilo-terminal rico en serina/arginina que facilitan la interacción entre diferentes factores de corte y empalme del RNA. En concreto, reconocen y unen secuencias de ARN GGNG y CCNG (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021). Las mutaciones de SRSF2 se agrupan en la prolina 95, siendo la mutación más frecuente una sustitución de histidina (P95H). Esto provoca una función alterada que conduce a un reconocimiento preferencial de los motivos CCNG (a diferencia del SRSF2 no mutado, que reconoce los motivos CCNG y GGNG por igual) (Grabek et al., 2020). Esto altera el equilibrio de empalme de numerosos pre-ARNm lo que causa una regulación negativa de EZH2 así como el empalme incorrecto de CASP8, que activa la señalización de NF- κ B involucrado en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

7.3. MUTACIONES EN REGULADORES TRANSCRIPCIONALES

Los pacientes con MPN suelen mostrar alteraciones en factores de transcripción, principalmente el factor nuclear eritroide 2 (NFE2) y RUNX1 (factor de transcripción de la familia RUNX 1), que suelen sobreexpresarse en pacientes con PV (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

Al estudiar cómo el aumento de los niveles de NFE2 contribuye a los MPN, Peeken et al identificaron 60 reguladores epigenéticos, entre ellos la histona desmetilasa JMJD1C que desmetila la histona H3K9, lo que permite una mayor transcripción génica (Copie-Bergman, 2018). En células hematopoyéticas sanas, la expresión de NFE2 se mantiene a un nivel bajo por la unión de HP1 α y por la presencia de H3K9 dimetilado. Las proteínas heterocromatina 1 (HP1) son una familia de proteínas altamente conservadas que, entre otras funciones, reprimen la transcripción de genes por formación de heterocromatina.

Las mutaciones descritas en NFE2 son deleciones de cuatro aminoácidos y cambios de desplazamiento. En los pacientes con PV existe una disminución de HP1 α y mayor expresión de JMJD1C asociados con una metilación disminuida de H3K9 a lo largo del locus NFE2 lo que aumenta la expresión de NFE (Copie-Bergman, 2018). Por contra, el silenciamiento de JMJD1C reduce selectivamente el crecimiento independiente de citoquinas mediado por JAK2 V617F, lo que sugiere un beneficio terapéutico potencial para la MPN (Jang & Choi, 2020) (ver Figura 11). NFE2 participa en cascadas inflamatorias aumentando la transcripción de IL-8 y promueve la proliferación activando la expresión de CDK4, CDK6 y ciclina D3. Además, produce especies reactivas de oxígeno (ROS), un grupo de moléculas que contienen oxígeno altamente reactivas que participan en

numerosos procesos biológicos. Esto da como resultado la oxidación de lípidos y proteínas y un aumento del daño oxidativo del ADN lo que provoca roturas del ADN que inducen inestabilidad. La producción excesiva de ROS y el posterior estrés oxidativo confieren una ventaja proliferativa a los clones de JAK2 V617F y activan las vías proinflamatorias (NF- κ B) que crean más ROS (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

Otro regulador transcripcional alterado en MPN es RUNX1 (factor de transcripción relacionado con Runt1) que está ubicado en el cromosoma 21q22.12 y juega un papel crítico en la hematopoyesis. A través de su interacción con el ADN, RUNX1 controla la expresión de genes diana implicados en la diferenciación hematopoyética, la regulación del ciclo celular, la biogénesis de los ribosomas y las vías p53 y TGF β (Grabek et al., 2020). Las mutaciones de RUNX1 inactivan la proteína, lo que conduce a una diferenciación mieloide reducida y un aumento de la autorrenovación de las HSC (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

Por último, otro de los reguladores importantes involucrado es TP53. El gen supresor de tumores TP53 se encuentra en el cromosoma 17 y codifica una proteína de unión al DNA que responde al daño del DNA induciendo programas transcripcionales que provocan la detención del ciclo celular o la apoptosis, entre otras respuestas celulares. La presencia de mutaciones de TP53 en la PV con la consiguiente pérdida de heterocigosidad conduce a la transformación leucémica (Grabek et al., 2020).

Existen numerosos reguladores “aguas arriba” de TP53 que se sobreexpresan en las neoplasias mieloproliferativas, como MDM2 y MDM4. Ambos inhiben la función de TP53, pues son capaces de facilitar la exportación de TP53 fuera del núcleo e inducir su degradación mediada por ubiquitina. La mutación en TP53 o en MDM2 parece ser la vía más común de transformación leucémica en PV y ET (Grabek et al., 2020). Finalmente, PPM1D es una serina-treonina fosfatasa que regula negativamente TP53 y se regula positivamente en la transcripción en la inducción de TP53. Las mutaciones en PPM1D conducen a una proteína que carece de un dominio de degradación carboxiterminal. Esto da como resultado una progresión alterada del ciclo celular, una disminución de la apoptosis (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

8. SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE PRONÓSTICO

Un determinante clave del tratamiento de pacientes con neoplasias mieloproliferativas es el pronóstico predicho. Por ejemplo, los pacientes que se espera que tengan un curso clínico benigno en el futuro, probablemente se beneficiarían de tratamientos dirigidos a minimizar el riesgo trombótico, mientras que aquellos que se espera que tengan una progresión a leucemia o insuficiencia de la médula ósea mielofibrótica podrían ser candidatos para terapia más intensiva. La clasificación actual de las neoplasias mieloproliferativas se ve obstaculizada por la heterogeneidad de la enfermedad dentro de los subtipos y la superposición clínica entre ellos. Una clasificación genómica tiene la virtud de identificar a los pacientes con factores biológicos causales compartidos y dirigir así las terapias nuevas a pacientes apropiados (Grinfeld et al., 2020).

Las características genómicas desempeñan un papel sustancial en la predicción de la progresión de la enfermedad. Así, por ejemplo, las mutaciones CALR se asocian de forma independiente con un mayor riesgo de transformación mielofibrótica. Las mutaciones adicionales en reguladores epigenéticos, factores de empalme y señalización vía RAS se asocian con la transformación mielofibrótica y leucémica. A pesar de que aún no se hayan incorporado en el sistema de puntuación pronóstica que se utiliza en pacientes con PV, datos recientes muestran el impacto pronóstico de la carga del alelo JAK2V617F, riesgo cardiovascular, y mutaciones de alto riesgo de ASXL1, SRSF2 e IDH2. Recientemente se ha propuesto agregar estas mutaciones adversas en el Sistema de puntuación de pronóstico internacional mejorado por mutaciones (MIPSS-PV) (Grabek et al., 2020).

El sistema de clasificación y pronóstico personalizado ha sido mejorado recientemente, identificando distintos subgrupos genéticos y correlacionándolos con el fenotipo de la enfermedad y el resultado del paciente de manera personalizada (Grinfeld et al., 2020). Este sistema mostró un rendimiento superior a los principales esquemas de pronóstico actuales en uso clínico, como el International Prognostic Scoring System (IPSS) o el Dynamic IPSS (DIPSS), ya que es capaz de generar predicciones de riesgo específicas como la supervivencia a largo plazo, la muerte en la fase crónica y la transformación mielofibrótica y leucémica, lo que es especialmente importante para los pacientes de riesgo intermedio pues permite predicciones más informativas. Grinfeld et al. crearon una calculadora personalizada para predecir el progreso de un paciente en puntos de tiempo dinámicos, presentando métricas de supervivencia e información sobre la biología de la enfermedad. Disponible en <https://www.sanger.ac.uk/science/tools/progmod/progmod/>

9. TRATAMIENTO DE LA POLICITEMIA VERA

El hecho de que las MPN se originan y se propagan por células madre que se renuevan por sí mismas y que se parecen mucho fenotípicamente a las HSC normales, representa tanto un desafío como una oportunidad terapéutica. El objetivo terapéutico radica, principalmente, en atacar a las células madre que propagan la enfermedad. Lamentablemente, se ha demostrado, que dichas poblaciones son tremendamente resistentes a las terapias que pueden inducir remisiones citogenéticas ya que no tienen una marcada actividad proliferativa. No obstante, dado que las mutaciones somáticas confieren una ventaja competitiva, las vías que median esta ventaja selectiva deberían, en principio, ser susceptibles de direccionamiento terapéutico (Mead & Mullally, 2017).

La única terapia curativa actual para las MPN y, por lo tanto, el único tratamiento que puede erradicar las células madre de la MPN, es el trasplante alogénico de HSC. Sin embargo la recaída es un hallazgo muy frecuente en estos pacientes, incluso después de la dosis altas de quimioterapia de acondicionamiento (Mead & Mullally, 2017). Además, debido a la toxicidad asociada con el procedimiento junto con una mayor morbilidad y mortalidad, este enfoque está actualmente restringido a una minoría de pacientes más jóvenes con MPN avanzadas (Loscocco et al., 2020).

Los pacientes con PV sufren una carga de síntomas sustancial y una longevidad reducida debido a complicaciones trombohemorrágicas o progresión a mielofibrosis o leucemia mieloide aguda (Brkic & Meyer, 2021). Por lo tanto, a día de hoy, la prevención de la trombosis y la progresión de la enfermedad forman el enfoque doble en la estrategia de tratamiento (Venugopal & Mascarenhas, 2020).

9.1. PREVENCIÓN DE TROMBOSIS

Los episodios trombóticos representan la principal causa de morbilidad y mortalidad para los pacientes, por lo que la estratificación del riesgo cardiovascular es de crucial importancia el momento del diagnóstico (Iurlo et al., 2020). Los pacientes menores de 60 años sin antecedentes de trombosis se clasifican como de “bajo riesgo” y se tratan de forma conservadora con flebotomía terapéutica para mantener un hematocrito inferior al 45% en la PV. Además, se les aconseja que optimicen los factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, presión arterial, obesidad) y se les prescribe aspirina en dosis bajas para la prevención de la trombosis (Venugopal & Mascarenhas, 2020). La terapia con aspirina en dosis bajas también es eficaz para aliviar las alteraciones microvasculares asociadas con la PV, ya que se cree que estos síntomas se deben a interacciones plaquetarias-endoteliales anormales basadas en vasos pequeños (Iurlo et al., 2020). Para muchos pacientes de bajo riesgo, la flebotomía y la aspirina pueden ser la única forma de tratamiento necesaria (Lengfelder et al., 2006).

A pesar de la flebotomía terapéutica, aún experimentan tasas de trombosis más altas de lo normal en comparación con la población general ya que, pueden no tener un hematocrito bien controlado (<45%) entre visitas. Además, puede provocar síntomas relacionados con la deficiencia de hierro que pueden exacerbar o imitar los síntomas relacionados con PV (Venugopal & Mascarenhas, 2020). En este sentido, se están evaluando análogos de hepcidina en PV como una alternativa a la flebotomía terapéutica, ya que la hepcidina regula el metabolismo del hierro, evitando su absorción a nivel intestinal e impidiendo la liberación del hierro desde los macrófagos a los precursores eritroides. PTG300 es un análogo de la hepcidina que ha demostrado frenar la disponibilidad de hierro para los precursores eritroides, lo que impide la eritropoyesis, dando como resultado la normalización del hematocrito (Kremyanskaya et al., 2020).

Por el contrario, los pacientes con PV de alto riesgo requieren tratamiento citorreductor para disminuir su nivel de hematocrito de forma permanente, eliminar la necesidad de flebotomía y disminuir el riesgo de coagulación. Además, dado el riesgo inherente de trombosis en la PV, independientemente de la estratificación de riesgo actual, está ganando impulso el movimiento para iniciar la terapia citorreductora en pacientes con PV de bajo riesgo (Venugopal & Mascarenhas, 2020).

9.2. TRATAMIENTOS CITORREDUCTORES

La terapia citorreductora está reservada para aquellos pacientes con características de “alto riesgo” (ver apartado 5.2.3. trombosis) y pacientes con PV de bajo riesgo que padecen síntomas incontrolados, esplenomegalia sintomática e intolerancia a la flebotomía terapéutica (Venugopal & Mascarenhas, 2020).

9.2.1. QUIMIOTERAPIA

La dosificación crónica a largo plazo con agentes quimioterapéuticos orales sigue siendo un pilar terapéutico. El quimioterápico más utilizado la hidroxiurea (hidroxicarbamida), un agente antineoplásico perteneciente a la familia de los antimetabolitos que inhibe la enzima ribonucleótido reductasa reduciendo así la producción de desoxirribonucleótidos (Grabek et al., 2020). Es el agente citorreductor recomendado en primera línea cuya indicación está basada en su efectividad en mejorar eficazmente la mielosupresión y reducir el riesgo de trombosis en comparación con el uso de flebotomía sola. En cambio, la eficacia de la hidroxiurea con respecto a la prolongación de la supervivencia y supervivencia libre de transformación a MF y leucemia aguda es controvertida ya que rara vez consigue respuestas moleculares (Mahuad, 2019).

La hidroxiurea es actualmente el tratamiento de elección para pacientes con PV mayores de 40 años y es bien tolerada en la mayoría de los pacientes siendo los efectos adversos más frecuentes molestias gastrointestinales como náuseas, intolerancia gástrica y diarrea por lo general leves (Mahuad, 2019). Sin embargo, algunos pacientes pueden no lograr un beneficio adecuado con las manifestaciones persistentes relacionadas con la enfermedad o pueden no tolerar la terapia a largo plazo. Los pacientes con resistencia o intolerancia a la HU, respectivamente, se asocian con un mayor riesgo de muerte y una calidad de vida alterada.

Otros agentes orales incluyen busulfán y pipobroman. El busulfán, un agente alquilante, ha mostrado una respuesta hematológica del 80% y molecular del 30% en pacientes con PV resistente a hidroxiurea, pero tiene datos contradictorios sobre si aumenta significativamente el riesgo de transformación leucémica; por lo tanto, a menudo se usa como segunda línea para períodos más cortos (Grabek et al., 2020).

9.2.2. INTERFERÓN

Si bien la hidroxiurea (HU) es el fármaco inicial de elección, se prefiere el interferón- α pegilado (IFN α) en pacientes más jóvenes que desean tener descendencia, ya que HU es un teratógeno potencial (Mahuad, 2019). En los últimos años, el interferón- α (IFN α), ha surgido como un enfoque prometedor en la MPN, particularmente en PV, con altas tasas de remisiones hematológicas y moleculares (Loscocco et al., 2020). En concreto, ha demostrado tasa de respuesta en PV, consiguiendo que una 94,6% de los pacientes lleguen a la remisión clínica (Grabek et al., 2020).

Un posible mecanismo por el cual logra remisiones moleculares, puede estar relacionado con su capacidad para estimular poblaciones de células madre normalmente inactivas. Esto lo consigue a través de sus efectores, los genes

estimulados por interferón (ISG) (Loscocco et al., 2020). Los interferones endógenos se definen como tipo 1, tipo 2 y tipo 3. Los IFN de tipo 2, en particular el IFN γ , participan en la respuesta inflamatoria que induce la fosforilación de JAK1 y JAK2 para activar STAT1. Los IFN tipo 1 (IFN α e IFN β) usan la fosforilación de JAK1 y Tyk2 para activar STAT1 y STAT2 y la inducción de ISG. De esta manera, la estimulación aguda de IFN α es capaz de estimular los genes ISG y activar así las células hematopoyéticas inactivas (Grabek et al., 2020). La exposición aguda a interferón, por tanto, promueve la proliferación celular desde un estado inactivo, pero la exposición crónica altera la función de las HSC y conduce a un agotamiento progresivo. Para evitar dicho agotamiento, las HSC pueden inducir el factor regulador de interferón 2 (IRF2) que es capaz de suprimir la señalización de IFN α para proteger las células madre inactivas del agotamiento dependiente de IFN tipo 1 y preservar la capacidad de autorenovación y diferenciación (Grabek et al., 2020).

El tratamiento con IFN α estimula tanto las células madre JAK2 V617F positivas como las quiescentes, pero conduce a una depleción preferencial de JAK2 V617F. Esto ocurre porque las células HSC mutantes para JAK2 V617F muestran un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño del ADN, en comparación con las de tipo salvaje (Grabek et al., 2020). Se han informado remisiones moleculares a largo plazo, es decir clon JAK2V617F indetectable, después de la interrupción de la terapia con interferón, lo que sugiere que las HSC mutantes JAK2V617F pueden ser erradicadas por interferón. Sin embargo, también se han observado recaídas moleculares después de la interrupción del interferón, lo que respalda el concepto de que, en algunos pacientes, las células madre de la MPN persisten y pueden mediar la recaída.

En este sentido, el Ropeginterferón alfa-2b monopegilado (Ropeg) ha recibido la aprobación en Europa como terapia de primera línea para pacientes con PV tras la demostración de su eficacia superior sobre la hidroxurea en el ensayo PROUD / CONTINUATION-PV (Loscocco et al., 2020). Se administra semanalmente lo que mejora la tolerabilidad del paciente garantizando el cumplimiento a largo plazo. Ropeg está actualmente aprobado en Europa como agente de primera línea para el tratamiento de la PV en ausencia de esplenomegalia sintomática.

Curiosamente, la presencia de mutaciones adicionales como TET2, ASXL1, IDH2 y TP53 se asocian con disminuciones más pequeñas de la carga de alelo JAK2V617F, provocando una resistencia molecular al interferón, lo que sugiere indirectamente que el panorama genómico de los pacientes con MPN puede predecir las respuestas al tratamiento (Loscocco et al., 2020).

9.2.3. INHIBIDORES DE JAK2

El desarrollo clínico de las terapias con inhibidores de JAK2 inició una nueva era de terapia molecular dirigida para las MPN BCR-ABL negativas (Mead & Mullally, 2017). Dado que la mutación JAK2 V617F impulsa la MPN a través de la activación de la señalización JAK-STAT, el desarrollo de inhibidores de JAK (JAKi) ha despertado un gran interés (Loscocco et al., 2020).

Existen dos tipos de inhibidores JAK2. Los de tipo 1 son compuestos competitivos con ATP, por lo que se dirigen al bolsillo de unión de ATP y estabilizan JAK. Paradójicamente, los compuestos que inhiben las JAK con un mecanismo de tipo I a pesar del bloqueo de la función de quinasa y la inhibición de la fosforilación de STAT, pueden aumentar la fosforilación del bucle de activación de JAK (Kate Shannon ., 2016). Tras la interrupción del inhibidor JAK en cambio, la reserva fosforilada se agota rápidamente, lo que conlleva un empeoramiento del síndrome clínico, lo que se conoce como abstinencia del inhibidor JAK (Grabek et al., 2020). La mayoría de los inhibidores clínicamente probados son de tipo 1 y se diferencian en su especificidad para JAK2. Muchos inhibidores se dirigen tanto a JAK2 como a JAK1 (ruxolitinib y momelotinib) y con menos frecuencia, están los que se dirigen solo a JAK2 (NS-018, pacritinib y fedratinib) (Li et al., 2019)

El uso de ruxolitinib se ha expandido a PV, particularmente para controlar la enfermedad en pacientes resistentes o intolerantes a la hidroxiurea. Ha demostrado ser superior para el control del hematocrito, la reducción del tamaño del bazo y la respuesta hematológica completa (Grabek et al., 2020). Sin embargo, los inhibidores de JAK2 tipo 1 han sido decepcionantes en su capacidad para inducir remisiones moleculares completas, ya que muestran una falta de reducción significativa en la carga del alelo JAK2V617F (Loscocco et al., 2020). Esto se debe a que, durante la neoplasia, existe una selección preferencial de aquellos progenitores multipotentes más comprometidos, lo que trae una incapacidad para bloquear significativamente la fosforilación de STAT1. Curiosamente, el tratamiento *ex vivo* con ruxolitinib sí que es capaz de bloquear completamente STAT1, lo que sugiere una concentración de fármaco intracelular inadecuada en las HSC mutadas (Grabek et al., 2020). Al final, el fracaso de los inhibidores de JAK2 para inducir la remisión molecular en las MPN negativas para BCR-ABL es la falta de eficacia de estos agentes para atacar las células madre de la MPN (Brkic & Meyer, 2021). Además, se ha visto que, la interrupción de ruxolitinib se asocia a la adquisición de mutaciones adicionales que ocurren principalmente en ASXL1, seguidas de TET2, EZH2 y TP53, por lo que se relaciona con una mayor evolución de la enfermedad y una disminución de la supervivencia global. Demostrando, por tanto, un potencial modificador de la enfermedad limitado, ya que no previene la evolución clonal de MPN con la adquisición de mutaciones adicionales (Loscocco et al., 2020). Esto resalta el limitado potencial modificador de la enfermedad de la terapia de agente único con inhibidor de JAK2 que requiere estrategias de tratamiento mejoradas (Brkic & Meyer, 2021).

Conociendo los mecanismos moleculares de cada fármaco, la combinación de IFN α y ruxolitinib parece ser interesante. Por un lado, el interferón aumenta STAT1 fosforilado para inducir a las células madre hematopoyéticas fuera de la inactividad y una vez activadas, ruxolitinib bloqueará la activación de STAT en poblaciones de progenitores eritroides. Los estudios de fase 2 de esta combinación mostraron una respuesta hematológica completa que se logró en el 44% de los pacientes con PV a los 12 meses de tratamiento (Grabek et al., 2020).

Los inhibidores de JAK2 tipo 2, reconocen la conformación inactiva de las quinasas y se unen al bolsillo de unión de ATP y a un bolsillo extra solo accesible

en la conformación de quinasas inactivas. Provocan de esta manera, una estabilización de JAK2 inactivo. En este caso, no se acumula la fosforilación y por tanto, no se observa el efecto de la abstinencia al inhibidor mencionada anteriormente (Brkic & Meyer, 2021). Al explotar los sitios de unión complementarios contiguos al bolsillo de unión de ATP los inhibidores de tipo II pueden ganar en especificidad y, por lo tanto, en selectividad. BBT594, CHZ868 y PDX son los inhibidores JAK2 tipo 2 publicados hasta la fecha utilizados solamente en modelos *in vitro* (Grabek et al., 2020). CHZ868 ha demostrado una eficacia mejorada en las neoplasias malignas impulsadas por JAK2, incluidas MPN y leucemia linfoblástica aguda de células B. Sin embargo, la señalización de JAK2 también es esencial para la función normal de las HSC, ya que su inhibición completa da como resultado graves defectos intrínsecos celulares en la función de las HSC, citopenias y supervivencia reducida (Brkic & Meyer, 2021).

Las estrategias para lograr la especificidad de la mutación pueden incluir el desarrollo de inhibidores alostéricos dirigidos al dominio de la pseudoquinasa JH2 (ver Figura 3) en lugar del dominio de la quinasa JH1. El desarrollo exitoso de inhibidores de tirosina quinasa 2 dirigidos al dominio pseudoquinasa es alentador y se espera que conduzca al desarrollo de inhibidores específicos de JAK2V617F (Brkic & Meyer, 2021).

La resistencia a los inhibidores de JAK2 representa un desafío clave para la terapia de la PV. Por ejemplo, se ha demostrado que la respuesta al ruxolitinib se pierde en el 50% de los pacientes que inicialmente se benefician en un período de 5 años; y se han propuesto varios mecanismos para la aparición de dichas resistencias (Brkic & Meyer, 2021).

En primer lugar, la exposición prolongada a inhibidores de JAK2, induce resistencia de las células MPN mediante la formación de heterodímeros de JAK2 con otros miembros de la familia JAK como JAK2-JAK1 y JAK2- TYK2 capaces de reactivar la señalización de JAK2 en presencia de inhibidores de JAK2. Por otra parte, se demostró que dicha resistencia es reversible, lo que se ajusta a la observación clínica de una sensibilidad renovada al ruxolitinib después de una interrupción del fármaco. Por lo tanto, el tratamiento intermitente con inhibidores de JAK2 podría representar un nuevo enfoque terapéutico. Sin embargo, cuando se interrumpe ruxolitinib, es frecuente que aparezca un rebote de citoquinas con el empeoramiento clínico del paciente, lo que plantea un desafío para esta estrategia (Brkic & Meyer, 2021) (Figura 12).

Por otra parte, mientras que los inhibidores de JAK2 suprimen eficazmente la vía de MAPK, pueden existir mecanismos de resistencia debido a que se activa la vía MAPK pero a través de otros receptores tirosina quinasas. Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas puede evitar la inhibición de JAK2 y mediar la activación compensadora de la vía MAPK (ver Figura 12). Una estrategia terapéutica frente a esto es, por tanto, un direccionamiento combinado de JAK2 y MAPK que mejore la eficacia terapéutica de ruxolitinib (Brkic & Meyer, 2021). La inhibición combinada de JAK2 y MAPK por ruxolitinib y binimetinib mejora los efectos del tratamiento, siendo particularmente eficaz para reducir la fibrosis de la médula ósea. Por una parte, los estudios preclínicos han demostrado una eficacia mejorada de la inhibición combinada de PI3K por BEZ235 y ruxolitinib, lo que llevó a estudios clínicos de

fase I / II que evaluaron inhibidores de PI3K como idelalisib, parsaclisib y umbralisib en combinación con ruxolitinib en mielofibrosis (Brkic & Meyer, 2021).

Los mecanismos de resistencia a la inhibición de JAK2 también pueden relacionarse con el microambiente de la médula ósea. Los niveles elevados de citoquinas inflamatorias y los propios fibrocitos positivos para JAK2V617F, protegen a las células estromales de los efectos de los inhibidores de JAK2.

El orden por el cual las mutaciones son adquiridas por el clon MPN impacta en la proliferación de progenitores hematopoyéticos, la presentación clínica y el riesgo de complicaciones trombóticas y, además, podría ser importante para la sensibilidad a la terapia con inhibidores de JAK2. Se ha observado que las células de pacientes con MPN con doble mutación JAK2 / TET2 responden mejor a ruxolitinib cuando se adquirió por primera vez JAK2V617F. Por lo tanto, ruxolitinib no previene la evolución clonal de MPN con la adquisición de mutaciones adicionales, pues hasta el 35% de los pacientes desarrollan al menos una mutación adicional, principalmente en ASXL1 , TET2 , EZH2 y TP53 (Brkic & Meyer, 2021).

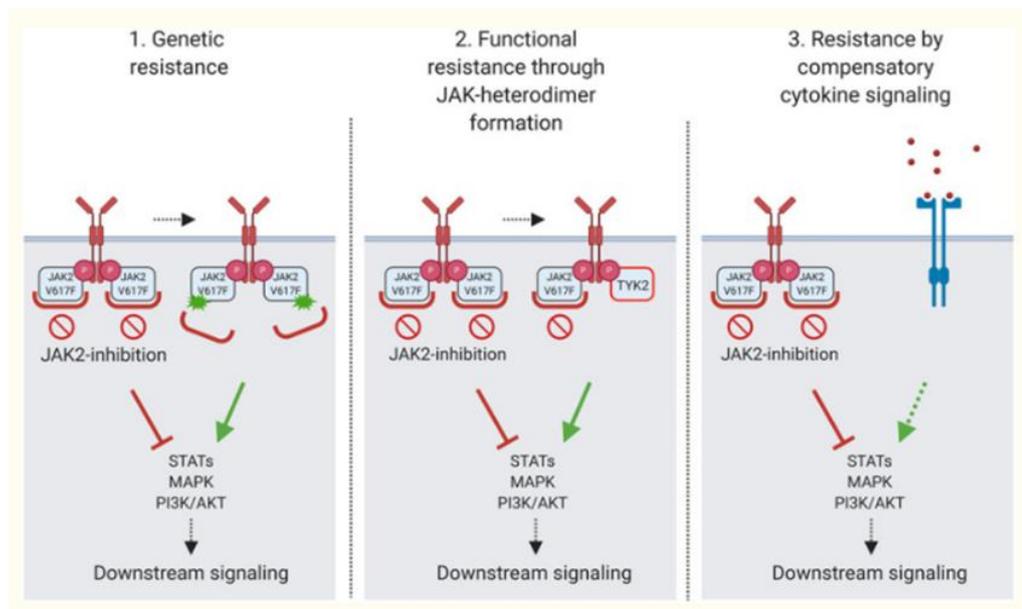


Figura 12. Mecanismos de resistencia a los inhibidores de JAK2. La resistencia a la inhibición de JAK2 puede desarrollarse mediante la adquisición de mutaciones de resistencia de JAK2 (1. resistencia genética) o mediante la formación de heterodímeros de JAK2 con JAK1 o tirosina quinasa 2 (TYK2), que mantienen funcionalmente la señalización intracelular (2.resistencia funcional). La resistencia intrínseca a la inhibición de JAK2 puede producirse por la activación de otras vías de señalización como, por ejemplo, la vía de MAPK debido a la activación a partir de receptores tirosina quinasa como el PDGFR (3. resistencia por señalización compensatoria) (Brkic & Meyer, 2021).

10. NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS

La comprensión de la biología de la MPN se ha profundizado en los últimos años y los mecanismos de resistencia se conocen cada vez más. Se han propuesto muchas dianas nuevas para la intervención terapéutica (Figura 13) y se están realizando numerosas investigaciones clínicas y preclínicas (Brkic & Meyer, 2021).

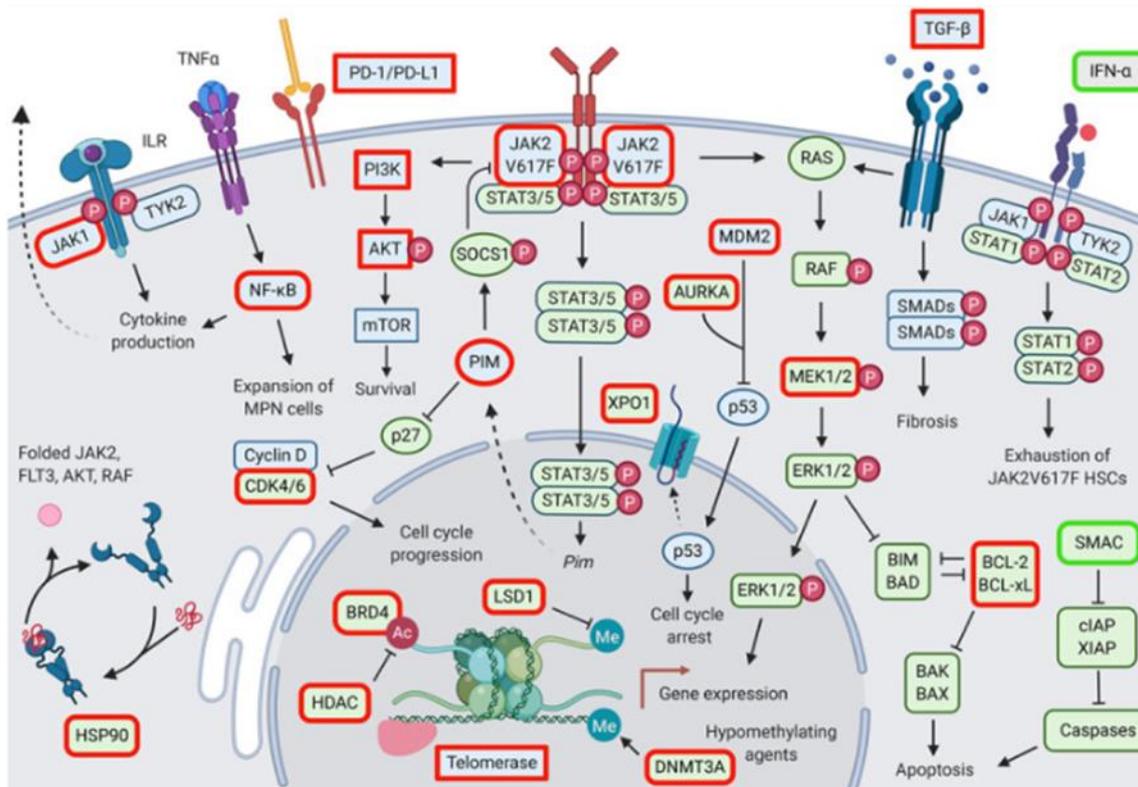


Figura 13 Posibles dianas terapéuticas en neoplasias mieloproliferativas. Las moléculas diana resaltadas en rojo están inhibidas, las moléculas diana resaltadas en verde están activada (Brkic & Meyer, 2021).

10.1. REGULACIÓN EPIGENÉTICA

Como se menciona en el apartado 6.1, las histonas compactan el genoma restringiendo el acceso del ADN a los factores de transcripción, y las enzimas que regulan este proceso constituyen una diana terapéutica potencial. Un ejemplo de ello son las enzimas histona deacetilasa (HDAC), que desacetilan residuos de lisina acetilados de las histonas. De esta manera, por ejemplo, los nucleosomas que llevan histonas con lisinas desacetiladas, mantienen una carga positiva y esto aumenta las interacciones entre nucleosomas generando una estructura más compacta (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

La desacetilación de la histona es un proceso bioquímico que se cree que cumple un papel en la promoción del crecimiento del tumor. Lo logra al silenciar algunos genes supresores de tumores, así como otros genes que son responsables de la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación. Panobinostat pertenece a una clase de inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) que ayuda a reactivar genes supresores de

tumores silenciados epigenéticamente (Brkic & Meyer, 2021). Por otra parte, al inhibir HDAC, induce la hiperacetilación de la proteína de choque térmico (hsp) 90, inhibiendo así su función. HSP90 es una proteína chaperona que ayuda a otras proteínas a plegarse adecuadamente (entre ellas RAF, AKT). Se ha demostrado, además, que las células mutadas JAK2 son más dependientes de HSP90 para la conservación de su crecimiento y supervivencia que las células mieloides normales (Gujarro-hernández & Vizmanos, 2021). El tratamiento con Panobinostat ha demostrado que normaliza el hematocrito y mejoran la supervivencia sin mielosupresión, así como supera la resistencia adquirida a la inhibición de JAK2. Varios estudios clínicos iniciales sobre Panobinostat/ ruxolitinib o Panobinostat como agente único en la MF están actualmente activos (Brkic & Meyer, 2021).

La metilación de la arginina de las colas de histonas es otra de las modificaciones epigenéticas que ocurren en las MPN y que está controlado por las proteínas PRMT. Éstas catalizan la metilación de residuos de arginina dentro de las colas de histonas provocando represión transcripcional. Se ha visto que JAK2V617F se une a PRMT5 con más afinidad que JAK2 de tipo salvaje y adquiere la capacidad de fosforilar PRMT5. Esto inhibe en gran medida su capacidad para metilar sus sustratos de histonas y representa una ganancia de función específica que les permite regular las modificaciones de la cromatina. La fosforilación de PRMT5 se ha detectado en muestras de pacientes positivas para JAK2V617F, y la regulación negativa de PRMT5 dio como resultado una mayor formación de colonias y diferenciación de eritroides indicando que la fosforilación de PRMT5 contribuye al fenotipo mieloproliferativo (Gujarro-hernández & Vizmanos, 2021). CTx034 es un inhibidor selectivo de PRMT5 desarrollado recientemente, que no solo ha demostrado suprimir la eritropoyesis mutante JAK2 sino que también activa p53 en los progenitores mutantes JAK2, a diferencia de Ruxolitinib (Li et al., 2019).

Como se explica en el apartado 4.3.1. las HSC positivas para JAK2V617F son capaces que producir de manera aberrante citoquinas proinflamatorias y estas observaciones proporcionan un fundamento sólido para investigar los mecanismos reguladores genéticos subyacentes que mantienen la inflamación crónica en los pacientes. Entre otros, NF- κ B actúa como un importante nodo de señalización inflamatoria en MPN. Dentro del núcleo, NF κ B reconoce los sitios NF κ B afines en las regiones promotoras de sus genes diana y dirige la unión de corre reguladores para formar la maquinaria transcripcional. Entre dichos corre reguladores se encuentran la familia de proteínas BET, entre ellos BRD4 (Hajmirza et al., 2018) (ver apartado 7.1.1). La función de la proteína BET es necesaria para la actividad transcripcional patológica de NF- κ B en MPN. La inhibición combinada de BRD4 / JAK2 ha mostrado resultados prometedores en la reducción de la inflamación, fibrosis y la carga de alelos mutantes. Actualmente, la combinación del inhibidor de BRD4 / BET CPI-0610 y ruxolitinib se investiga en pacientes con MF sin tratamiento previo y sin tratamiento previo con ruxolitinib en un estudio de fase 1/2 (Brkic & Meyer, 2021).

10.2. INHIBIDORES DE HSP90

Las proteínas de choque térmico (HSP) son actores clave durante la inflamación. Por ejemplo, HSP70 activa TLR2 y TLR4, lo que lleva a la activación de NFκB y aumenta la producción de TNF-α, IL1-β e IL-6. HSP90 es una proteína chaperona responsable del plegamiento correcto de muchas proteínas de señalización, incluidas BCR-ABL, FLT3, AKT y estabiliza numerosas proteínas, como JAK2 (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021) (ver Figura 13).

PU-H71 es un inhibidor de HSP90, que induce a la vez la degradación de JAK2. El tratamiento con PU-H71 ha mostrado resultados prometedores en modelos preclínicos normalizando el hematocrito y mejoran la supervivencia sin mielosupresión. La inhibición de HSP90 también ha sido capaz de superar la resistencia adquirida a la inhibición de JAK2. Actualmente se encuentran activos varios estudios clínicos iniciales sobre PU-H71 / ruxolitinib o PU-H71 combinados como agente único en la mielofibrosis. Los estudios del inhibidor de HSP90 luminespib (AUY922) se detuvieron debido a la aparición de hemorragia gastrointestinal (Guijarro-hernández & Vizmanos, 2021).

10.3. INHIBIDORES DE MDM2

Varios agentes en desarrollo clínico se muestran prometedores con respecto a su capacidad para atacar las células madre MPN. Por ejemplo, se ha descubierto que el tratamiento *in vitro* de células CD34⁺ positivas para JAK2V617F con inhibidores de MDM2 (solos o en combinación con interferón) reduce la carga del alelo JAK2V617F (Mead & Mullally, 2017). MDM2 es un importante regulador negativo de p53 (promueve la degradación de p53) (ver apartado 7.3), por lo que los inhibidores de HDM2 pueden desencadenar la apoptosis en células con la función de p53 intacta, activando p53 (Li et al., 2019) (ver Figura 13).

El inhibidor de MDM2 KRT-232 está bajo investigación en MF (Brkic & Meyer, 2021) y otro candidato clínico inhibidor de HDM2 idasanutlin se está estudiando actualmente en un ensayo de fase 1 en pacientes con PV. Es de destacar que los inhibidores de MDM2 pueden causar una trombocitemia significativa al promover la apoptosis de los progenitores de megacariocitos mediada por p53 (Li et al., 2019).

10.4. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS

La inhibición de los miembros de la familia de BCL-2, que son reguladores esenciales de la muerte celular apoptótica, se desarrolló principalmente para el tratamiento de neoplasias linfoides, pero también tiene potencial para las neoplasias mieloides. Los estudios preclínicos mostraron una mayor eficacia mediante la inhibición combinada de BCL-2 / JAK2, y la inhibición de BCL-2 podría superar la resistencia a la inhibición de JAK2 en células MPN. Los estudios clínicos de navitoclax en combinación con ruxolitinib o como agente único están evaluando el potencial en MF (Brkic & Meyer, 2021).

10.5. INMUNOTERAPIA

La capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar células tumorales se denomina vigilancia inmunológica, y este conocimiento ha llevado a que la respuesta inmune sea vista como un arma terapéutica en el tratamiento del cáncer. James P. Allison y Tasuku Honjo ganaron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2018 por descubrir un tratamiento contra el cáncer actuando sobre los puntos de control inmunológicos. En condiciones normales, los prototipos puntos de control inmunológico son la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) que son inhibidores de la proliferación y función de las células T (Han et al., 2020). El descubrimiento de cómo PD-1 en las células T se une a PD-L1 en las células tumorales u otras células en el microambiente tumoral, ha aumentado la comprensión de cómo los tumores que están inundados de linfocitos que infiltran el tumor, evaden la destrucción inmunomediada. PD-1 es expresado por células T activadas, y la unión de PD-1 a células PD-L1 + en el microambiente tumoral hace que las células T sean anérgicas (Han et al., 2020).

El eje PD-1 / PD-L1 se puede modular mediante varias señales en las células cancerosas. Un ejemplo de ello es la vía JAK/STAT. Los genes JAK2 y PD-L1 están ubicados en el cromosoma 9p24 y recientemente se ha descrito que la vía JAK/STAT induce la expresión de PD-L1 en células JAK2 V617F positivas. Los pacientes con MPN tienen niveles aumentados de PD-L1 pero a la vez, presentan subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos específicos de PD-L1 capaces de reconocer y destruir células que expresan PD-L1. Por tanto, los CTL específicos de PD-L1 pueden mejorar eficazmente la fase efectora de la respuesta inmune (Holmström et al., 2020).

Se ha visto que los pacientes con PV no avanzada tienen respuestas más fuertes y frecuentes en comparación con los pacientes con MPN avanzada, por lo que tienen más probabilidades de tener una respuesta a la vacunación terapéutica contra el cáncer. Dado que la expresión de las proteínas inmunorreguladoras fundamentales PD-L1 aumenta en la MPN, la vacunación contra PD-L1 mejorará la respuesta inmune antitumoral en los pacientes y, en consecuencia, se ha lanzado un ensayo clínico de vacunación de fase I / II con epítopos derivados de PD-L1 en pacientes con MPN (Holmström et al., 2020).

Para los pacientes con mielofibrosis avanzada, no se cree que la vacunación con péptidos induzca una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. Como tal, otra modalidad de tratamiento avanzada sería la terapia adoptiva de células T, en la que se infunden al paciente células T autólogas reactivas al tumor. Estas células T reactivas a tumores se pueden cultivar a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). La obtención de TIL de pacientes con PMF requeriría obtener células de la médula ósea, lo que no es posible en estos pacientes debido a la médula fibrótica (es decir, "punción seca"). Sin embargo, es posible expandir un cultivo de células T específico para un antígeno específico de tumor dado (por ejemplo, JAK2V617F), clonar el receptor de células T específico de JAK2V617F (TCR) y transducir el TCR en células T autólogas. Estas células podrían luego expandirse y reinfundirse en el paciente (Holmström et al., 2020).

10.6. AGENTES ANTIFIBRÓTICOS

La fibrosis de la médula ósea representa una característica clave de la MPN progresiva, particularmente la MF, que media la citopenia. Se cree que los megacariocitos atípicos abundantes en MF promueven la fibrosis de la médula ósea a través de citoquinas secretadas.

Alisertib es un inhibidor oral de las proteínas aurora quinasas que son mediadores esenciales en la mitosis celular. Evaluado en un estudio de fase 1 en MF, normalizó el linaje de megacariocitos y redujo la fibrosis de la médula ósea. Enfoques adicionales para interferir con la fibrosis de la médula ósea incluyen el factor TGF- β . AVID200 es una proteína de fusión TGF- β -receptor-Fc recombinante que actúa neutralizando selectivamente TGF- β -1 y 3, actualmente investigada en MF. La inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 β por un inhibidor selectivo 9-ING-41 también ha mostrado potencial para disminuir la fibrosis inducida por TGF- β en MF (Brkic & Meyer, 2021).

11. CONCLUSIONES

El descubrimiento de las mutaciones conductoras JAK2, CALR y MPL han aclarado la base genética de las MPN y gracias a la introducción de técnicas NGS de alto rendimiento se ha ampliado enormemente el conocimiento del panorama mutacional. Todo esto ha llevado al mejor conocimiento fisiopatológico de las MPN, incluida la policitemia vera, lo que permite afinar el diagnóstico, atribuir un mejor puntaje de pronóstico y monitorizar la respuesta al tratamiento. El objetivo es que en el futuro podamos brindar una atención óptima y dirigida a los pacientes con MPN para paliar los síntomas, mejorar la calidad de vida y aumentar la supervivencia general. Como consecuencia, actualmente están en fase de ensayos clínicos nuevas terapias dirigidas a dianas específicas con resultados clínicos prometedores.

12. BIBLIOGRAFIA

- Asada, S., Goyama, S., Inoue, D., Shikata, S., Takeda, R., Fukushima, T., Yonezawa, T., Fujino, T., Hayashi, Y., Kawabata, K. C., Fukuyama, T., Tanaka, Y., Yokoyama, A., Yamazaki, S., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Kojima, S., Kawazu, M., Mano, H., & Kitamura, T. (2018). Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukaemogenesis. *Nature Communications*, *9*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05085-9>
- Balasubramani, A., Larjo, A., Bassein, J. A., Chang, X., Hastie, R. B., Togher, S. M., Lähdesmäki, H., & Rao, A. (2015). Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nature Communications*, *6*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms8307>
- Bar-Natan, M., & Hoffman, R. (2019). New insights into the causes of thrombotic events in patients with myeloproliferative neoplasms raise the possibility of novel therapeutic approaches. *Haematologica*, *104*(1), 3–6. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205989>
- Bates, I., & Ekem, I. (2015). Haematological Aspects of Tropical Diseases. In *Postgraduate Haematology: Seventh Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118853771.ch49>
- Brkic, S., & Meyer, S. C. (2021). Challenges and Perspectives for Therapeutic Targeting of Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere*, *5*(1), e516. <https://doi.org/10.1097/hs9.0000000000000516>
- Chotinantakul, K., & Leeanansaksiri, W. (2012). Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Research*, *2012*(July 2012), 1–16. <https://doi.org/10.1155/2012/270425>
- Copie-Bergman, C. (2018). Double-hit DLBCL: Should we limit FISH testing? *Blood*, *131*(18), 1997–1998. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836361>
- Cross, N. (2019). Myeloproliferative neoplasms. *HemaSphere*, *3*(S2), 141. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000263>
- Cuthbert, D., & Stein, B. L. (2019). Polycythemia vera-associated complications: Pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *Journal of Blood Medicine*, *10*, 359–371. <https://doi.org/10.2147/JBM.S189922>
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Ferrao, R. D., Wallweber, H. J. A., & Lupardus, P. J. (2018). Receptor-mediated dimerization of JAK2 FERM domains is required for JAK2 activation. *ELife*, *7*, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.38089>
- Flores-figueroa, E., & Pelayo, R. (2009). Hematopoyesis Cancerología 2. *Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales, Unidad de Investigación Médica En Enfermedades Oncológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.*, *2*, 95–107.
- Grabek, J., Straube, J., Bywater, M., & Lane, S. W. (2020). MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on

Treatment. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081901>

Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E. J., Wedge, D. C., Cantrill, R., Godfrey, A. L., & Papaemmanuil, E. (2020). *Europe PMC Funders Group Disease heterogeneity and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms*. 379(15), 1416–1430. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716614.Disease>

Grinfeld, J., Nangalia, J., & Green, A. R. (2017). Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 102(1), 7–17. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.113845>

Guijarro-hernández, A., & Vizmanos, J. L. (2021). A broad overview of signaling in ph-negative classic myeloproliferative neoplasms. *Cancers*, 13(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers13050984>

Hajmirza, A., Emadali, A., Gauthier, A., Casasnovas, O., Gressin, R., & Callanan, M. B. (2018). BET family protein BRD4: An emerging actor in NFκB signaling in inflammation and cancer. *Biomedicines*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010016>

Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727–742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>

Holmström, M. O., Hasselbalch, H. C., & Andersen, M. H. (2020). Cancer immune therapy for Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Cancers*, 12(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers12071763>

Iurlo, A., Cattaneo, D., Bucelli, C., & Baldini, L. (2020). New perspectives on polycythemia vera: From diagnosis to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21165805>

Jang, M. A., & Choi, C. W. (2020). Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean Journal of Internal Medicine*, 35(1), 1–11. <https://doi.org/10.3904/kjim.2019.317>

Jones, R. (2014). NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0279.Molecular>

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Loscalzo, J., & Larry, J. (2016). Harrison Principios de Medicina Interna 19a edición Vol. 2. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 2). <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9788491130338002202>

Kate Shannon ., G. O. D. P. J. S. J. M. C. F. R. N. (2016). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0324.Modulation>

Kickler, T. S. (2005). Hematology: Basic Principles and Practice, 4th edition. In *Transfusion* (Vol. 45, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00192.x>

Kremyanskaya, M., Ginzburg, Y., Kuykendall, A. T., Yacoub, A., Yang, J., Gupta, S. K., Valone, F., Khanna, S., Verstovsek, S., & Hoffman, R. (2020). PTG-300 Eliminates the Need for Therapeutic Phlebotomy in Both Low and High-Risk Polycythemia Vera Patients. *Blood*, 136(Supplement 1), 33–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-137285>

- Lanikova, L., Babosova, O., & Prchal, J. T. (2019). Experimental modeling of myeloproliferative neoplasms. *Genes*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/genes10100813>
- Lengfelder, E., Merx, K., & Hehlmann, R. (2006). Diagnosis and therapy of polycythemia vera. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *32*(3), 267–275. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939438>
- Li, B., Rampal, R. K., & Xiao, Z. (2019). Targeted therapies for myeloproliferative neoplasms. *Biomarker Research*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0166-y>
- Loscocco, G. G., Guglielmelli, P., & Vannucchi, A. M. (2020). <p>Impact of Mutational Profile on the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Short Review of the Emerging Data</p>. *OncoTargets and Therapy*, *Volume 13*, 12367–12382. <https://doi.org/10.2147/ott.s287944>
- Mackman, N. (2018). The red blood cell death receptor and thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(9), 3747–3749. <https://doi.org/10.1172/JCI122881>
- Mahuad, C. (2019). *Hidroxiurea en neoplasias mieloproliferativas Ph negativas : experiencia en la Argentina* . 24–30.
- Mead, A. J., & Mullally, A. (2017). Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*, *129*(12), 1607–1616. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696005>
- Mendiola Valle, A., & Soto Cruz, I. (2005). Vía Jak-Stat: Una Visión General. *Vertientes*, *8*, 14–25.
- Moraleda Jimenez, J. . (2017). Pregrado de Hematología. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 356, Issue 1408).
- Next Generation Sequencing in MPNs . Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of*. (2020).
- Sauvageau, M., & Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: Multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*, *7*(3), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.002>
- Skov, V. (2020). Next Generation Sequencing in MPNs. Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of Prognosis and Treatment Responses. *Cancers*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/cancers12082194>
- Solary, E., Bernard, O. A., Tefferi, A., Fuks, F., & Vainchenker, W. (2014). The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*, *28*(3), 485–496. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.337>
- Spivak, J. L. (2019). How I treat polycythemia vera. *Blood*, *134*(4), 341–352. <https://doi.org/10.1182/blood.2018834044>
- Szybinski, J., & Meyer, S. C. (2021). Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *35*(2), 217–236. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.12.002>
- Tefferi, A., Lasho, T. L., Guglielmelli, P., Finke, C. M., Rotunno, G., Elala, Y., Pacilli, A., Hanson, C. A., Pancrazzi, A., Ketterling, R. P., Mannarelli, C., Barraco, D., Fanelli,

- T., Pardanani, A., Gangat, N., & Vannucchi, A. M. (2016). Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*, 1(1), 21–30. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000216>
- Trikha, P., & Carson, W. E. (2014). Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1846(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.003>
- Vainchenker, W., & Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129(6), 667–679. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>
- Venugopal, S., & Mascarenhas, J. (2020). Novel therapeutics in myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00995-y>
- Wang, L., Wheeler, D. A., & Prchal, J. T. (2016). Acquired uniparental disomy of chromosome 9p in hematologic malignancies. *Experimental Hematology*, 44(8), 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.11.005>
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: the science of change. *Environmental Health Perspectives*, 114(3), 160–167. <https://doi.org/10.1289/ehp.114-a160>

13. ANEXO

Proposed 2016 WHO diagnostic criteria for BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms.

Polycythemia vera (PV) ^a	Essential thrombocythemia (ET) ^b	Primary myelofibrosis (PMF) ^c	
Major criteria			
1 Hemoglobin >16.5 g/dl (men) >16 g/dl (women) or hematocrit >49% (men) >48% (women) or increased red cell mass (RCM)	Platelet count $\geq 450 \times 10^9/l$	prePM Megakaryocytic proliferation and atypia ^d , without reticulin fibrosis > grade 1, ^e accompanied by increased age-adjusted bone marrow cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Overt PMF Megakaryocyte proliferation and atypia ^d accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2 BM with age-adjusted hypercellularity and trilineage myeloproliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (differences in size)	BM with megakaryocyte proliferation with large and mature morphology. No significant left-shift of neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3 Presence of JAK2 mutation	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, PMF, MDS or other myeloid neoplasm	Presence of JAK2, CALR or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker ^f or absence of minor reactive bone marrow reticulin fibrosis ^g	Presence of JAK2, CALR or MPL mutation or in the absence, the presence of another clonal marker ^f or absence of evidence for reactive bone marrow fibrosis ^h
4	Presence of JAK2, CALR or MPL mutation		
Minor criteria			
1 Subnormal serum erythropoietin level	Presence of a clonal marker (e.g. abnormal karyotype) or absence of evidence for reactive thrombocytosis	Presence of one or more of the following ⁱ : <ul style="list-style-type: none"> • Anemia not attributed to a comorbid condition • Palpable splenomegaly • Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$ 	Presence of one or more of the following ⁱ : <ul style="list-style-type: none"> • Anemia not attributed to a comorbid condition • Palpable splenomegaly

Proposed 2016 WHO diagnostic criteria for BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. Abbreviations: BM, bone marrow; CML, chronic myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome.

a PV diagnosis requires meeting either all three major criteria or the first two major criteria and one minor criterion.

b ET diagnosis requires meeting all four major criteria or first three major criteria and one minor criterion.

c prePMF diagnosis requires all three major criteria and at least one minor criterion. Overt PMF diagnosis requires meeting all three major criteria and at least one minor criterion.

d Small-to-large megakaryocytes with aberrant nuclear/cytoplasmic ratio and hyperchromatic and irregularly folded nuclei and dense clustering.

e In cases with grade 1 reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (that is, prePMF).

f In the absence of any of the 3 major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) are of help in determining the clonal nature of the disease.

g Minor (grade 1) reticulin fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies.

h Bone marrow fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy or toxic (chronic) myelopathies.

i Confirmed in two consecutive determinations.

j Degree of abnormality can be borderline or marked and institutional reference range should be used for lactate dehydrogenase level (LDH)