

# Biología molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas: 10 años después del JAK2

Molecular pathogenesis of chronic  
myeloproliferative neoplasms

Paula G. Heller

Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.  
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. UE IDIM-CONICET

paulaheller@hotmail.com



Neoplasias  
Mieloproliferativas  
Phi negativos

HEMATOLOGÍA, Vol 19: 40 - 44  
Número Extraordinario  
XXII CONGRESO  
Octubre 2015

**Palabras clave:** Neoplasias Mieloproliferativas,  
JAK2,  
CALR,  
Epigenética

**Keywords:** chronic myeloproliferative neoplasms,  
JAK2,  
CALR,  
Epigenetics

## Mutación *JAK2V617F*

La biología molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Phi-negativas (NMP) permaneció desconocida hasta el año 2005, en que el descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* marcó un hito en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a estas patologías<sup>(1)</sup>. Esta mutación, localizada en el exón 14 del gen *JAK2*, induce la activación constitutiva del JAK2 y de las vías de señalización intracelular que se encuentran río abajo del mismo, incluidas moléculas de las familias STAT y las cascadas MAPK/ERK y PI3K/AKT. El *JAK2V617F* constituye la alteración molecular más frecuente en NMP, detectándose en más de 95% de los pacientes con Policitemia Vera (PV) y alrededor de 50-60% de aquellos con Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MFP). Este marcador molecular se incluye actualmente entre los cri-

terios diagnósticos para PV, TE y MFP. Además de su importancia a nivel diagnóstico, esta mutación tiene implicancias clínicas, particularmente en la TE. La positividad para *JAK2V617F* en pacientes con TE se asocia a cifras superiores de hemoglobina y leucocitos, menor trombocitosis y mayor riesgo trombótico<sup>(2, 3)</sup>. En base a esto último, el *JAK2V617F* constituye uno de los parámetros incluidos actualmente en el sistema pronóstico internacional propuesto para estratificar el riesgo trombótico en TE (IPSET-trombosis)<sup>(4)</sup>. El descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* puso de manifiesto el rol central de la activación de las cascadas de señalización gatilladas por JAK2 en la patogenia de las NMP, lo cual promovió el desarrollo de inhibidores JAK1/2 como terapia dirigida para estas neoplasias.

### Otras mutaciones en la vía JAK/STAT

Estudios posteriores al descubrimiento del *JAK2V617F*, identificaron mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2* en pacientes con PV negativos para la mutación *JAK2V617F*. Éstas se detectan en 4% de las PV y representan 60-80% de las PV *JAK2V617F*-negativas. Esto indica que la posibilidad de PV en ausencia de mutación del *JAK2* (ya sea *V617F* o del exón 12) es excepcional. Las mutaciones del exón 12 tienden a presentarse como eritrocitosis aislada aunque su evolución no difiere de aquella de pacientes *JAK2V617F*-positivos<sup>(5)</sup>. En pacientes con TE y MFP negativos para la mutación *JAK2V617F*, se identificaron mutaciones en el exón 10 del receptor de Trombopoyetina *MPL*, las que se detectan en 1-4% y 5-11% de pacientes con TE y MFP, respectivamente<sup>(6)</sup>. Con menor frecuencia, existen otras mutaciones que afectan moléculas inhibitorias de la vía JAK/STAT, como el *CBL* o *LNK* que, como el caso de las anteriores, llevan a la activación de esta vía de señalización<sup>(7)</sup>.

### Carga alélica *JAK2V617F*

Además de la presencia o ausencia de la mutación *JAK2V617F*, la carga alélica de la misma, es decir la proporción entre el alelo mutado y el total (mutado+normal), influye en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El nivel de *JAK2V617F* es menor en TE, intermedio en PV y MFP mientras que los niveles mayores se observan en la MF post-PV. Estas diferencias en la carga alélica contribuyen a explicar en parte el hecho de que una sola mutación (*JAK2V617F*) se asocie a distintos fenotipos mieloproliferativos. A mayor carga alélica en TE y PV, mayor es la frecuencia de trombosis y evolución a mielofibrosis<sup>(8)</sup>. Por el contrario, en MF bajos niveles de carga alélica (inferiores al 25%) se asocian a peor pronóstico<sup>(9)</sup>. La utilidad de la medición de la carga alélica en la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y el manejo terapéutico no ha sido aún definida. La carga alélica puede disminuir e incluso puede haber remisiones moleculares completas durante el tratamiento con algunas drogas, como es el caso del interferón alfa<sup>(10)</sup>. El efecto del ruxolitinib en la carga es en general modesto, si bien se ha descrito en estudios recientes que el tratamiento prolongado puede inducir remisiones moleculares en un pequeño porcentaje de pacientes con MF, PV o TE<sup>(11, 12)</sup>. El rol de la determinación de la carga alélica en el monitoreo de la respuesta molecular no es aún claro.

### Participación de citoquinas proinflamatorias en la patogenia de las NMP

Recientemente se ha puesto de relevancia la importancia de la producción exacerbada de diversas citoquinas proinflamatorias, incluidas entre otras,  $TNF\alpha$ , IL-6 e IL-8, en las manifestaciones clínicas (fundamentalmente los síntomas sistémicos y la caquexia) y el pronóstico de las NMP<sup>(13)</sup>. Estas citoquinas son producidas tanto por las células malignas como por células no malignas, reflejando la contribución del microambiente tumoral al desarrollo y progresión de estas neoplasias<sup>(14)</sup>. Muchas de estas citoquinas actúan vía JAK1. La propiedad que presentan ciertos inhibidores de JAK2, como el ruxolitinib, de inhibir también JAK1 contribuye a atenuar esta tormenta de citoquinas, explicando en parte su efecto terapéutico.

### Inhibidores del JAK

El inhibidor de JAK1/2 ruxolitinib se encuentra actualmente aprobado para el tratamiento de pacientes con Mielofibrosis (MF) y con PV resistentes o refractarios a la hidroxiurea<sup>(13, 15)</sup>. El ruxolitinib induce clara mejoría en las manifestaciones clínicas, reduciendo los síntomas sistémicos y la esplenomegalia y prolongaría la supervivencia<sup>(16)</sup>. En el caso de la PV, disminuye el requerimiento de flebotomías. Sin embargo, no obstante el beneficio clínico de esta droga, como se mencionó, las respuestas moleculares suelen ser modestas en la mayoría de los pacientes. Una de las explicaciones propuestas, consiste en el denominado fenómeno de persistencia. En estudios en modelos experimentales, se ha observado que durante la exposición prolongada a ruxolitinib las células escapan al efecto inhibitorio debido a que el JAK2 es activado en forma cruzada por otras moléculas de la familia JAK (*JAK1*, *TYK2*)<sup>(17)</sup>. Los inhibidores disponibles hasta el momento, incluido el ruxolitinib, son de tipo I, los cuales inhiben el JAK2 en su conformación activa. Recientemente se ha desarrollado otro tipo de inhibidores del JAK2 (tipo II), los que se unen al JAK2 en su conformación inactiva. Éstos han demostrado en estudios *in vitro* y en modelos animales ser más potentes que los de tipo I, con mayor actividad relativa frente al JAK2 mutado (*V617F*) respecto al no mutado y mayor impacto en el clon mieloproliferativo y en la reducción de la carga alélica. En estos modelos, los inhibidores tipo II contrarrestan el fenómeno de persistencia observado *in vitro* con los tipo I. En presencia de los mismos no hay activación cruzada del JAK2 por otras moléculas de la familia JAK, permitiendo una inhibición profunda y sostenida<sup>(18)</sup>. Estudios futuros determinarán si estos resultados obtenidos en mo-

delos preclínicos pueden extrapolarse a la clínica y si estos nuevos inhibidores brindarán beneficios adicionales.

### Mutaciones en el gen de la calreticulina (*CALR*)

No obstante los considerables avances obtenidos mediante la identificación de las mutaciones en genes de la vía JAK/STAT, en genes involucrados en la regulación epigenética y que intervienen en la maquinaria de *splicing* (descrito a continuación), la alteración molecular causal de una considerable proporción de casos de TE y MFP permaneció desconocida durante la mayor parte de esta última década. La identificación de mutaciones en el gen *CALR* a fines del año 2013 significó otro gran salto en el esclarecimiento de la biología molecular de las NMP<sup>(19, 20)</sup>. La calreticulina es una proteína multifuncional involucrada en el control de calidad de las proteínas del retículo endoplásmico, asegurando el correcto plegamiento de glicoproteínas, y en la homeostasis del calcio, entre otras acciones. Las mutaciones halladas en NMP consisten en deleciones o inserciones localizadas en el exón 9 del gen que generan un corrimiento del marco de lectura modificando el extremo C-terminal de la proteína. Si bien existen una variedad de mutaciones, hay 2 que son más frecuentes y comprenden una deleción de 50pb (mutación tipo 1) y la inserción de 5pb (tipo 2). Podrían existir diferencias clínicas y pronósticas entre ambas. Las mutaciones *CALR* se detectan en 15-25% de pacientes con TE y 20-35% de aquellos con MFP, no coexisten en general con mutaciones *JAK2* ni *MPL*. Si se considera solamente los pacientes negativos para estas mutaciones, la frecuencia de mutaciones en *CALR* asciende a 50-70% en TE y 65-85% en MFP. En base a la frecuencia de estas mutaciones, el algoritmo propuesto actualmente para el diagnóstico molecular en TE y MFP comienza con el estudio de *JAK2V617F*, seguido por *CALR* y por último, de las mutaciones en el *MPL*.

El correlato clínico de las mutaciones *CALR* muestra en TE que los pacientes *CALR*-positivos tienen mayor trombocitosis, con menor frecuencia de compromiso de series eritroide y mieloide y menor frecuencia de trombosis comparado con los *JAK2V617F*-positivos, mientras que no habría diferencias significativas en la evolución a mielofibrosis, en la transformación leucémica ni en la supervivencia<sup>(21, 22)</sup>. Por otro lado, los pacientes con MF *CALR*-positivos se encuentran en general en un grupo de riesgo (DIPSS-plus) más bajo y la positividad para estas mutaciones se asocia a menor frecuencia de anemia y trombocitopenia y mejor supervivencia, mientras que los pacientes triple-negativos (es decir negativos

para *JAK2*, *MPL* y *CALR*) son los que presentan peor pronóstico<sup>(23)</sup>. Este impacto positivo en el pronóstico podría estar limitado a aquellos portadores de mutaciones tipo 1 y también es influenciado por la presencia o no de otras mutaciones. Si bien los mecanismos que median la transformación neoplásica de las mutaciones en *CALR* no son claros, se ha demostrado que, así como las mutaciones en *JAK2* y *MPL*, éstas también inducen activación de la vía JAK/STAT. Este hallazgo pone de manifiesto que la activación de la vía JAK/STAT constituye un evento común en la patogenia molecular de las NMP, aún en pacientes que no presentan mutaciones en *JAK2*<sup>(24)</sup>. Esta noción es consistente con el hecho de los pacientes *JAK2*-negativos responden a los inhibidores de *JAK2*.

### Mutaciones en genes epigenéticos y en la maquinaria de *splicing*

Las mutaciones en los genes anteriormente descritos, *JAK2*, *MPL* y *CALR*, constituyen alteraciones genéticas denominadas “*drivers*”, es decir que están directamente relacionadas al fenotipo mieloproliferativo<sup>(25)</sup>. Éstas son relativamente específicas de los NMP Phi-negativos, encontrándose con muy baja frecuencia en otras neoplasias mieloides. A diferencia de éstas, existe otro grupo de mutaciones, que si bien no son responsables del fenotipo mieloproliferativo en sí, se encuentran involucradas en el proceso de transformación neoplásica y frecuentemente se asocian con progresión de enfermedad. Este grupo de mutaciones incluyen genes que intervienen en la regulación epigenética y otros relacionados a la maquinaria de *splicing* del ARN. En general, éstas son más frecuentes en MF y en la fase de transformación leucémica que en PV y TE, excepto las mutaciones en *TET2* que se observan en los tres fenotipos mieloproliferativos. Estas mutaciones no son específicas de las NMP Phi-negativas sino que se encuentran con igual o mayor frecuencia en síndromes mielodisplásicos y leucemias mieloides agudas. Las mutaciones epigenéticas comprenden alteraciones en *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* y *DNMT3*<sup>(26)</sup>, mientras que las relacionadas al *splicing* incluyen *SRSF2* y *SF3B1*<sup>(27)</sup>. Estas mutaciones frecuentemente coexisten con las mutaciones *driver*. El orden de adquisición de las mutaciones (*drivers* vs. epigenéticas) es variable, así por ejemplo el *JAK2V617F* puede preceder la adquisición de *TET2* o viceversa. La complejidad de las alteraciones halladas en muchos de los casos sugiere la presencia de inestabilidad genómica<sup>(7)</sup>.

La mayoría de las mismas (*ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, *SRSF2*) se asocian a un peor pronóstico, incluyen-

do una sobrevida más corta y un mayor riesgo de evolución leucémica, definiendo un grupo de alto riesgo molecular, que representa alrededor de un tercio de los pacientes con MF y que presenta impacto pronóstico adverso independiente de la categoría DIPSS-plus<sup>(28)</sup>. Asimismo, el número de mutaciones de mal pronóstico también influye en la evolución, siendo peor la presencia de 2 o más respecto a una sola mutación. Si bien hasta el presente, no existen recomendaciones claras respecto a la influencia del perfil mutacional en la conducta terapéutica, es posible que el mismo constituya un factor determinante de la misma en el futuro.

### Conclusión

En esta última década, el espectro de mutaciones que caracteriza a las NMP se ha ampliado sustancialmente desde el descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*. El panorama actual es mucho más complejo de lo previsto, sobretodo en MF, siendo heterogéneo entre distintos pacientes. Actualmente, mediante técnicas de nueva generación, es posible detectar alteraciones moleculares en el 90% de los pacientes con NMP, incluyendo algunas en genes poco conocidos<sup>(29)</sup>. En muchos de estos pacientes, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada, existe más de una mutación y el perfil mutacional tiene implicancias pronósticas.

El descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* se ha traducido en avances terapéuticos concretos, reflejado por la disponibilidad actual de los inhibidores de JAK2. Desde el punto de vista terapéutico, aún queda un camino por recorrer. Es de esperar que los conocimientos adquiridos a partir del 2005 y el estudio de la interrelación entre las distintas alteraciones moleculares estimulen nuevos desarrollos terapéuticos, probablemente basado en combinaciones de drogas, y que esto redunde en mayores beneficios para los pacientes.

### Declaración de conflictos de interés:

La autora declara no poseer conflictos de interés.

### Bibliografía

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J y col. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-8.
2. Campbell PJ, Scott LM, Buck G y col. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2 V617F* mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1945-53.
3. Heller PG, Lev PR, Salim JP y col. *JAK2V617F* mutation in platelets from essential thrombocytopenia patients: correlation with clinical features and analysis of *STAT5* phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006; 77: 210-6.
4. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A y col. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocytopenia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012 Dec 20; 120:5128-33.
5. Scott LM, Tong W, Levine RL y col. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-68.
6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T y col. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006; 3: e270.
7. Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011: 208-14.
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of *JAK2V617F* presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008; 22: 1299-307.
9. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G y col. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of *JAK2V617F* mutated allele. *Blood* 2009; 114: 1477-83.

10. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshouri T y col. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon  $\alpha$ -2a. *Blood* 2013; 122: 893-901.
11. Pieri L, Pancrazzi A, Pacilli A y col. JAK2V617F complete molecular remission in polycythemia vera/essential thrombocythemia patients treated with ruxolitinib. *Blood* 2015; 125: 3352-3.
12. Deininger M, Radich J, Burn TC, Huber R, Paranagama D, Verstovsek S. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015 Jul 30. pii: blood-2015-03-635235.
13. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA y col. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010; 363: 1117-27.
14. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P y col. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov* 2015; 5: 316-31.
15. Verstovsek S., Passamonti F., Rambaldi A., Varosi G. et al A Phase2 study of Ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced Polycythemia Vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea, *Cancer*, 2014, 120:513-520.
16. Vannucchi AM, Kantarjian HM, Kiladjian JJ y col. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase 3 trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. *Haematologica*. 2015 Jun 11. pii: haematol.2014.119545.
17. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O y col. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature* 2012; 489: 155-9.
18. Meyer SC, Keller MD, Chiu S y col. CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell* 2015; 28: 15-28.
19. Nangalia J, Massie C, Baxter E y col. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013; 369:2391-405, 2013
20. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS y col. Somatic mutation of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369: 2379-90.
21. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P y col. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 123:1552-
22. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL y col. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014; 28: 2300-3.
23. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM y col. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014; 28: 1472-7.
24. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O y col. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014; 123: e123-33.
25. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol* 2015; 43: 599-608.
26. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenetics* 2011; 2: 197-212.
27. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y y col. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478: 64-9.
28. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P y col. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013; 27: 1861-9.
29. Lundberg P, Karow A, Nienhold R y col. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123: 2220-8.