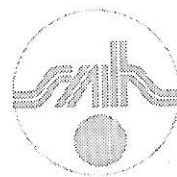


Rol de la mutación JAK2V617F en los síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Philadelphia-negativos

Paula G. Heller

Hematología Investigación. IDIM Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Unidad Ejecutora IDIM-Conicet

*Fecha de recepción: 15/2/07
Fecha de aceptación: 1/3/07*



ARTÍCULO
ESPECIAL

HEMATOLOGIA, Vol. 10 Nº 3: 84-87
Setiembre-Diciembre, 2006

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMP) cromosoma Philadelphia negativos [Ph(-)] clásicos constituyen desórdenes clonales originados por transformación de la *stem cell* hematopoyética pluripotencial. Se caracterizan por la expansión de una o más progenies hematopoyéticas con aumento de células maduras en sangre periférica, predominando uno u otro linaje dependiendo de la patología. Comprenden la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide (MMM). Estas entidades comparten diversas características clínicas y biológicas, entre ellas la presencia de hipersensibilidad a citoquinas, el crecimiento espontáneo de colonias hematopoyéticas en ausencia del agregado de factores de crecimiento, la tendencia a presentar complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas y propensión al desarrollo de leucemia mieloide aguda. A diferencia de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), cuya etiología molecular se conoce desde hace muchos años, la patogenia de los SMP Ph (-) clásicos permaneció desconocida hasta principios del año 2005, cuando 4 grupos independientes reportaron el hallazgo de la mutación puntual V617F en el gen *JAK2* en la mayoría de los pacientes con PV y en alrededor de la mitad de los pacientes con TE y MMM^{1,4}. El *JAK2* es una tirosinquinasa que media la transmisión de la señal a partir de receptores de diversas citoquinas, como la trombopoyetina (TPO), eritropoyetina (EPO) y factor de crecimiento

granulocito-macrófago (G-CSF). La mutación *JAK2V617F*, localizada en el dominio autoinhibitorio del *JAK2*, interferiría con su actividad regulatoria negativa, causando la activación constitutiva de la quinasa. Este avance en el conocimiento de la patogenia de los SMP plantea nuevas posibilidades respecto a la clasificación y al diagnóstico de estas patologías y abre nuevas perspectivas terapéuticas.

FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN JAK2V617F EN SMP

La frecuencia de esta mutación varía en las distintas patologías y depende de la técnica empleada para su detección. En estudios iniciales, se empleó la secuenciación de ADN y luego se utilizaron técnicas más sensibles como la PCR alelo específica, cuya sensibilidad es 1-3%^{1,5}. Las frecuencias reportadas oscilan entre 65-97% en PV, 23-57% en TE y 45-55% en MMM⁶. Más recientemente, mediante PCR en tiempo real, técnica cuya sensibilidad es de 0.5-1%, la frecuencia de detección de la mutación fue superior, hasta 72% en TE y 99% en PV⁷. Existen pacientes homocigotas para la mutación, siendo este hecho más frecuente en PV (25-33%), poco frecuente en TE (0-7%) y variable en MMM (3-19%). La progresión de heterocigosidad a homocigosidad se debe a recombinación mitótica, mecanismo que involucra el intercambio entre cromosomas homólogos durante la mi-

tos y que resulta en 2 alelos mutados⁸. Los estudios de la mutación fueron realizados fundamentalmente en leucocitos totales o en granulocitos. Dado que en TE la serie megacariocítica es la predominantemente comprometida, nuestro grupo postuló que la frecuencia del *JAK2V617F* en este linaje podría ser superior al hallado en granulocitos en esta entidad, en cuyo caso el estudio en plaquetas podría incrementar el rendimiento diagnóstico. Mediante PCR alelo específica y PCR seguida de digestión con BsaXI, evaluamos la mutación en el RNA de plaquetas de 50 pacientes con TE. La frecuencia hallada (48%) no difirió de lo reportado en granulocitos utilizando técnicas de similar sensibilidad (41-57%), lo cual sugiere que la presencia de la mutación restringida a la serie megacariocítica no es un evento frecuente⁹ y que su estudio en plaquetas no ofrecería ventajas respecto al de granulocitos. Esta mutación no es específica de los SMP Ph (-) clásicos, ya que se encuentra, en menor porcentaje, en SMP atípicos (2-33%) y menos frecuentemente en síndromes mielodisplásicos (1-5%) y leucemia mieloide aguda (0.5%). Por el contrario, no se ha detectado esta alteración en pacientes con trombocitosis reactiva, poliglobulia secundaria, LMC ni en neoplasias linfoides. Más recientemente, con técnicas de mayor sensibilidad (0.01%) respecto a las utilizadas para diagnóstico, se detectaron bajos niveles de *JAK2V617F* en sangre periférica de alrededor del 10% de controles normales¹⁰.

UTILIDAD DE LA MUTACIÓN *JAK2V617F* A NIVEL DIAGNÓSTICO

La ausencia durante muchos años de un marcador molecular de los SMP Ph (-) llevó a que el diagnóstico de estas entidades se efectuara por exclusión de desórdenes reactivos. Por lo tanto, una de las principales aplicaciones diagnósticas del *JAK2V617F* radicaría en el diagnóstico diferencial entre desórdenes clonales y reactivos¹¹. Existen propuestas para incluir el estudio del *JAK2V617F* en los criterios diagnósticos de SMP, aunque estos nuevos criterios no están aún universalmente aceptados^{12,13}. Aún no es claro si la presencia del *JAK2V617F* constituirá un marcador molecular de SMP Ph (-), en forma análoga al BCR-ABL en LMC. A este respecto, es importante tener en cuenta que la presencia de esta alteración molecular no discrimina entre los distintos SMP Ph (-) clásicos y que por otra parte solo alrededor de la mitad de los pacientes con TE y MMM son *JAK2V617F*-positivos. La patogenia de la enfermedad en los pacientes *JAK2V617F*-negativos es un área de intensa investigación, habiéndose identificado una mutación en el gen del receptor de Trombopoyetina *c-MPL*, (*MPL515*), en un 5% y 1% de pacientes con MMM y TE, respectivamente¹⁴.

CORRELACIÓN CLÍNICA

La presencia de la mutación *JAK2V617F* se asocia a ciertos marcadores biológicos, como el crecimiento espontáneo de colonias eritroides, la sobreexpresión de PRV-1¹⁵, activación de leucocitos y plaquetas¹⁶ y movilización de progenitores CD34(+)¹⁷. Sin embargo, las implicancias de la misma en las manifestaciones clínicas, la evolución y el pronóstico aún no se han establecido. Con el objeto de evaluar este aspecto, nuestro grupo analizó la relación entre la mutación del *JAK2* y las características clínicas y datos de laboratorio de 50 pacientes con TE. Este estudio reveló que los pacientes *JAK2V617F* positivos presentaban edad más avanzada al diagnóstico, cifras de hemoglobina significativamente más elevadas, 14.3 ± 1.5 g/dl vs. 12.9 ± 1.4 g/dl, $p=0.002$, y mayor frecuencia de transformación a PV, siendo de 8% en los pacientes positivos, mientras que ningún paciente *JAK2V617F* negativo presentó esta evolución⁸. Estos hallazgos fueron confirmados simultáneamente por varios autores^{17,18} y demuestran que, siendo la TE una enfermedad heterogénea, los pacientes *JAK2V617F* (+) constituirían un subgrupo con fenotipo similar a la PV (11). Por otra parte, en nuestra serie, la frecuencia de trombosis fue significativamente mayor en los pacientes *JAK2V617F*(+) respecto a los *JAK2V617F*(-), 46 vs 4% ($p=0.0006$), y hubo una tendencia a una mayor frecuencia de alteraciones de la microcirculación, 37.5 vs. 19% (0.2). En este estudio, la mutación constituyó un factor de riesgo trombótico independiente mediante un análisis multivariado, $p=0.015$, OR ajustado 19.9 (IC 95% 1.7-225.4)⁹. Sin embargo, los resultados publicados respecto a la influencia del *JAK2* en la trombosis son dispares. Mientras dos estudios no revelaron una correlación significativa^{19,20}, otros autores reportaron una mayor frecuencia de trombosis, ya sea venosa¹⁸ o eventos vasculares, incluyendo grandes vasos y microcirculación²¹. Por otra parte, en PV, en la cual la gran mayoría de los pacientes son positivos para el *JAK2V617F*, se hallaron algunas diferencias entre los pacientes homocigotas y heterocigotas, presentando los primeros cifras más elevadas de hemoglobina, mayor frecuencia de prurito y de evolución a mielofibrosis²². En MMM, la mutación *JAK2V617F* se asoció en un estudio a una menor sobrevida, siendo éste el primer indicio que este marcador molecular podría tener una influencia en el pronóstico²³. Aún no hay datos claros respecto a la influencia del *JAK2V617F* en el riesgo de transformación leucémica, siendo aparente que serían necesarios eventos moleculares adicionales en la patogenia de esta evolución. Se han reportado casos de pacientes con SMP *JAK2V617F* positivos, en quienes no se detectó la mutación luego de la transformación leucémica²⁴.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA MUTACIÓN JAK2V617F

El JAK2 mutado induce en líneas celulares hipersensibilidad e independencia de factores de crecimiento y fosforilación constitutiva del JAK2 y sus sustratos⁴, mientras que en modelos animales, se asocia a eritrocitosis y fibrosis medular^{25, 26}. Sin embargo, aún no se ha definido en los pacientes con SMP, los efectos de esta mutación a nivel celular. Para investigar este aspecto, evaluamos mediante Western blot la presencia de fosforilación constitutiva del STAT5, uno de los principales blancos del JAK2, en plaquetas de 12 pacientes con TE, 7 JAK2V617F (+) y 5 JAK2V617F (-)⁹. Contrariamente a lo esperado, no se detectó STAT5 fosforilado (STAT5-P) constitutivamente en estas muestras, a pesar de la presencia de niveles adecuados de STAT5 total y de la detección de STAT5-P en respuesta a la estimulación con TPO. Este resultado podría deberse al efecto inhibitorio del JAK2 *wild-type* sobre el mutado, o a la defosforilación del STAT5-P en las plaquetas por mayor susceptibilidad a la acción de fosfatasa. Sería de interés evaluar si otros blancos del JAK2 distintos al STAT-5 se hallan fosforilados en forma constitutiva en las plaquetas.

Existen aún varias incógnitas relativas al efecto patogénico de esta mutación, como ser el mecanismo mediante el cual una única alteración molecular puede inducir distintos fenotipos^{27, 28}. Se postula que podrían existir diferencias en la célula blanco, en el nivel del JAK2 mutado y/o modificadores genéticos o biológicos. La mutación se detecta a nivel de *stem cell*²⁹, granulocitos, progenitores eritroides, plaquetas, y, en algunos pacientes, también en linfocitos B y T³⁰, confirmando que la célula de origen de los SMP es una célula madre pluripotencial. El requerimiento del JAK2 mutado de receptores de citoquina tipo I, como el de TPO, EPO y G-CSF para ejercer su efecto patogénico explicaría la mayor expansión del linaje mielóide respecto al linfóide³¹. Por otra parte, la secuencia de eventos en la patogenia de los SMP todavía no ha sido definida, cuestionándose si la mutación del JAK2 es el evento causal o si ocurre sobre la base de una alteración clonal previa, como lo sugiere el estudio de SMP familiares³².

El descubrimiento de la mutación del JAK2 ofrece un potencial blanco terapéutico dada la posibilidad de desarrollar inhibidores de esta tirosinquinasa. Actualmente existen inhibidores del JAK2 que han demostrado eficacia *in vitro* en líneas celulares y en células de pacientes con PV⁴, aunque aún no se ha determinado su potencial uso clínico. Un inconveniente a este respecto es el rol fundamental que posee el JAK2 no solo en la hematopoyesis sino además

en otras funciones fisiológicas, por lo cual deberá evaluarse su tolerancia.

En conclusión, han habido importantes avances en el conocimiento de la mutación JAK2V617F desde su descubrimiento, aunque aún restan muchos interrogantes por develar. Es probable que en los próximos años estas incógnitas comiencen a ser aclaradas y se determine la utilidad de la terapéutica dirigida hacia este blanco molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baxter A, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
2. Levine RL, Wadleigh M, Coombs J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
4. James C, Ugo V, Le Couédic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes Polycythemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
5. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162-2168.
6. Tefferi A, Gilliland G. The JAK2^{V617F} tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 947-958.
7. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M et al. X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107: 4139-4141.
8. Cazzola M, Passamonti F. Not just clonal expansion of hematopoietic cells but also activation of their progeny in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2006; 91: 159-161.
9. Heller PG, Lev PR, Salim JP et al. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006; 77: 210-216.
10. Sidon P, El Housni H, Dessars B et al. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia advance online publication*, doi:10.1038/sj.leu.2404292.
11. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2^{V617F}: When to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006; 30: 965-970.
12. Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology* 2005. *American Society of Hematology Education Book* 201-208.
13. James C, Delhommeau F, Marzac C et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 350-353.
14. Pardanani A, Levine RL, Lasho TL et al. MPLS151 mutation in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; prepublished online July 25, doi: 10.1182/blood-2006-04-018879.

15. Goerttler PS, Steimle C, Marz E et al. The jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005; 106: 2862-2864.
16. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91: 169-175.
17. Passamonti F, Rumi E, Pietra D et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34-positive cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107: 3676-3682.
18. Campbell PJ, Scott LM, Buck G et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1945-1953.
19. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM et al. JAK2^{V617F} mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131: 208-213.
20. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19: 1847-1849.
21. Cheung B, Radia D, Pantelidis P et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 2005; 132: 244-250.
22. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2^{V617F} in Polycythemia Vera. *Cancer* 2006; 106: 631-635.
23. Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K et al. The V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006; 107: 2098-2100.
24. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations and role in leukemic transformation. *Blood* 2006; 108: 3548-3555.
25. Wernig G, Mercher T, Okabe R et al. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107: 4274-4281.
26. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M et al. JAK2^{V617F} expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108: 1652-1660.
27. Villeval JL, Chloé J, Pisani DF et al. New insights into the pathogenesis of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders and consequences for the management of patients. *Semin Thromb Haemost* 2006; 32: 341-351.
28. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005; 11: 546-554.
29. Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA et al. The JAK2 V617F occurs in hematopoietic stem cells and predisposes toward erythroid differentiation. *PNAS* 2006; 103: 6224-6229.
30. Ishii T, Bruno E, Hoffman R et al. Involvement of various hematopoietic cell lineages by the JAK2^{V617F} mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006; prepublished online June 6, doi: 10.1182/blood-2006-04-017392.
31. Lu X, Levine R, Tong W et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *PNAS* 2005; 102: 18962-18967.
32. Bellane-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 346-352.