



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Facultad de Medicina



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

Tesis

ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE INMUNOLÓGICO EN PACIENTES CON
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".

Que presenta:

Miguel Enrique Cuéllar Mendoza

Para obtener el título de:
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Tutores de Tesis

Dr. Daniel Montante Montes de Oca
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Anatomía Patológica
Departamento de Anatomía Patológica

Dra. Diana Elodia Aguilar León
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Anatomía Patológica

Ciudad de México, México
2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MEMORIA DE TESIS

ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE INMUNOLÓGICO EN PACIENTES CON
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".

TUTORES DE TESIS

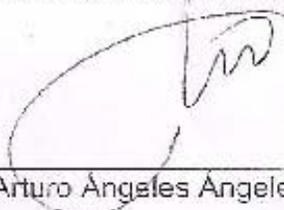


Dra. Diana Erodia Aguilar León
Investigadora en Ciencias Médicas
adjunta al Departamento de Patología, INCMNSZ



Dr. Daniel Montante Montes de Oca
Médico especialista en Anatomía Patológica
adjunta al Departamento de Patología, INCMNSZ

Profesor Titular del Curso de Especialidad en Anatomía Patológica, INCMNSZ



Dr. Arturo Angeles Angeles

DIRECTOR DE ENSEÑANZA, INCMNSZ



Dr. Sergio Ponce de León Rosales

*A mis Padres
A mis maestros
A todas las personas que me han ayudado en este largo camino*

“No importa como comiences, lo importante es como termines”

CONTENIDO

MARCO TEORICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
JUSTIFICACION.....	34
HIPOTESIS.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

MARCO TEÓRICO

El nombre de enfermedades mieloproliferativas fue utilizado ~~usado~~ por primera vez en 1951 por el Hematólogo William Dameshek para describir a un grupo de patologías con similitud en la proliferación descontrolada de precursores medulares de células sanguíneas. En la década de los 50 se incluían 4 enfermedades: Policitemia Vera (PV), la trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis idiopática (MF) y leucemia mieloide crónica (LMC). Posteriormente (2011) se incluyeron en el grupo el síndrome hipereosinofílico y mastocitosis sistémica.

Las anteriores son enfermedades que tienen como característica común proliferación descontrolada de precursores de los linajes mieloides (eritroide, granulocítico, megacariocítico o células cebadas). Cada una de las neoplasias mieloproliferativas puede llevar a falla de la médula ósea por mielofibrosis, con una inadecuada hematopoyesis o transformación blástica (definida como < 20% de blastos en sangre periférica o médula ósea). En 2005 se describe la mutación JAK2 V617F como evidencia que relaciona a tirosina cinasas que activan el crecimiento celular independiente de los mecanismos clásicos de activación. La OMS integra en el 2011 dentro de las neoplasias mieloproliferativas: leucemia mieloide crónica BCR/ABL positiva, la leucemia neutrofilica crónica, la policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria (PMF), trombocitemia esencial (TE), leucemia crónica eosinofílica, enfermedad de células cebadas y neoplasias mieloproliferativas clasificables.

Actualmente diversos grupos de investigación tratan de esclarecer la causa de las neoplasias mieloproliferativas. Las células mieloides, así como algunos linfocitos B, T y NK derivan de una célula troncal hematopoyética afectada; la fibrosis que suele

acompañar a este tipo de neoplasias se debe a la secreción de citocinas por células de la médula ósea, las cuales estimulan a los fibroblastos para la producción de fibras y la deposición en tejido conectivo de las mismas. Se ha descrito que en PV existe un incremento de las cuentas de eritrocitos con ausencia eritropoyetina (EPO) y llegan a ser más sensibles a esta última que las personas sin enfermedad. Estas observaciones han hecho que los estudios centren su atención en las vías de señalización como responsables de la patogénesis de la enfermedad.

La leucemia con células con cromosoma philadelphia consiste en el acortamiento del cromosoma 22 como consecuencia del intercambio de ADN entre los brazos largos de Los paciente con LMC suelen tener cromosoma Philadelphia (Ph) positivo; la cual es una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 : $t(9;22)(q34;q11.2)$. Esto ocasiona la fusión de dos genes: el BCR en el cromosoma 22 y el ABL1 en el cromosoma 9; con la consecuencia biológica de la formación de una tirosina cinasa constitutivamente activa. La presencia de este gen lleva a la activación de las vías de señalización que implican a RAS, RAF, ERK, JNK, MYC, JAK/STAT, PI3 cinasa-AKT y NFkB, los cuales favorecen que las células puedan diferenciarse, proliferar y sobrevivir. En los pacientes con eosinofilia se han visto involucrados los genes PDGFRA (4q12) y PDGFRB (5Q33). En 2005 se identificó una mutación en el gen que codifica a la cinasa Janus 2 (JAK2) en la mayoría de los pacientes con PV y en el 50% de los pacientes con TE y MFP (1). La mutación es una sustitución de una valina por una fenilalanina en el codón 617 de la proteína JAK 2 (V617F). Las cinasas JAK son esenciales en la señalización de las citocinas, ya que se asocian a receptores de citocinas tipo 1 que carecen de actividad de cinasa intrínseca. Normalmente las cinasas JAK tienen un dominio

inhibidor denominado JH2; la mutación en el codón 617 lleva a la pérdida de esta función inhibidora y a la ganancia de función de esta cinasa. JAK 2 es la cinasa que se asocia al receptor de EPO, pero también se puede asociar al receptor de eritropoyetina y al factor estimulante de colonias granulocíticas. La autofosforilación de JAK permite el reclutamiento de las proteínas activadoras de la transcripción y traductoras de señal (STAT), las cuales permiten la transcripción génica en el núcleo. En el caso de las leucemias mieloides crónicas se han descrito rearrreglos génicos de BCR con JAK 2. Se han identificado otras mutaciones, como aquellas presentes en el gen de la calreticulina (CALR) que ocurre en el 20-35% de los pacientes con trombocitosis esencial o mielofibrosis primaria. Normalmente las mutaciones entre CALR y JAK 2 son mutuamente excluyentes. Las mutaciones en el receptor de la trombopoyetina MPL se pueden encontrar en el 3-8% de los pacientes con neoplasias mieloproliferativas. A los pacientes en los que no se encuentran estas mutaciones se les denomina triple negativos, aunque parecen tener un aumento en la señalización de JAK2. Otra de las mutaciones que se pueden encontrar son aquellas activadoras asociadas al receptor del factor estimulante de colonias granulocíticas (CSF3R) que también señala a través de Jak2.

Se ha observado que dependiendo de la mutación las características clínicas de los pacientes tienen diferentes características clínicas. Aquellos con mutaciones de JAK 2 son generalmente mayores, con mayores niveles de hemoglobina, leucocitosis, menores niveles de plaquetas, un aumento en el riesgo de trombosis. Las mutaciones en CALR se han asociado a una edad menor, mayores cuentas plaquetarias, menores frecuencias de anemia, leucocitosis y mutaciones del espliceosoma.

La característica clínica común a todas ellas es la hematopoyesis extramedular exuberante que condiciona esplenomegalia, su probable transformación a leucemia aguda, la formación de fibrosis en médula osea y el riesgo de trombosis y eventos hemorrágicos.

En el estudio propuesto se estudian la leucemia mieloide crónica BCR-ABL 1 positiva, la trombocitosis esencial, la mielofibrosis primaria y la policitemia vera.

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA BCR ABL 1 POSITIVA

La leucemia mieloide crónica BCR-ABL 1 positiva es una enfermedad rara que afecta de 1 a 2 personas por 100,000 personas. Es la más estudiada de las neoplasias hematopoyéticas, el pico de edad es en la séptima década de la vida con un ligero predominio masculino. Los síntomas de estos pacientes son inespecíficos como la fatiga y el letargo o pueden corresponder a los de la esplenomegalia encontrada hasta en el 50% de los pacientes. En la biometría hemática se encuentra un aumento en la cuenta de la serie blanca, debida principalmente a un aumento en la cantidad de neutrófilos en diferentes estadios de maduración, los cuales suelen ser morfológicamente normales; la cuenta de blastos por lo general es menor al 2% y nunca excede del 10%. Se suele encontrar basofilia absoluta, eosinofilia y la cuenta plaquetaria es normal o elevada; la trombocitopenia es poco frecuente. La hemoglobina por debajo de 10g/dL se ve solo en 25 al 30% de los pacientes. Se encuentra asociada al gen de fusión BCR-ABL 1 y al cromosoma Ph; esta alteración se encuentra en todas las células del linaje mieloide, células endoteliales y linfocitos B, T y NK. En hasta el 95% de los pacientes se identifica el cromosoma Ph por cariotipo, en el 5% restante se puede encontrar por FISH o PCR. Algunas otras de las alteraciones genéticas que se han relacionado

con la LMC incluyen +8, +Ph e isocromosoma 17 (q10). Pocos pacientes pueden presentar la mutación JAK2 V617F en conjunción con la traslocación BCR-ABL1 lo cual se ha llegado a asociar a características morfológicas como la mielofibrosis y a megacariocitos aumentados de tamaño y atípicos; esta mutación también se ha visto posterior al tratamiento o en pacientes con otra neoplasia mieloproliferativa JAK2 positiva.

La historia clínica de una LMC sin tratamiento es una fase indolente crónica, seguida de una fase acelerada y una fase blástica.

La fase acelerada se define como un incremento en los leucocitos $>10 \times 10^9$ o esplenomegalia persistente o aumentada, trombocitosis persistente $>1000 \times 10^9/L$ sin controlar por terapia, trombocitopenia persistente $< 100 \times 10^9/L$ sin relación a la terapia, evolución citogenética clonal después del diagnóstico inicial con cariotipo, $>20\%$ de basófilos en sangre periférica y 10-19% de mieloblastos en sangre periférica o médula ósea. La proliferación megacariocítica en sabanas asociada a fibras de reticulina o fibrosis o displasia granulocítica severa se deben de considerar como evidencia presuntiva de fase acelerada.

La fase blástica recuerda a la leucemia aguda y es diagnosticada cuando se encuentran 20% o más de blastos en sangre periférica o médula ósea; o cuando hay una proliferación blástica extramedular (sarcoma mielóide) en la que los blastos distorsionan el tejido en el cual se encuentran. En la médula ósea los blastos se pueden encontrar en la región intertrabecular. En el 20 a 30% de las progresiones blásticas se encuentran compuestas por linfoblastos comúnmente de fenotipo B. Los genes que se han asociado a estas fases de progresión incluyen a RB, TP53, MYC, EV11 y p16. Se ha propuesto que la persistencia y progresión de la

enfermedad pueden deberse a la generación de clonas que son resistentes a los inhibidores de tirosin cinasa como el imatinib.

Se han desarrollado medicamentos que inhiben específicamente a la tirosina cinasa BCR-ABL1 anormal.

Los hallazgos que se pueden encontrar en la médula ósea es hiper celularidad con un aumento del linaje neutrofilico (“myelocyte bulge”). Las capas de células inmaduras que se encuentran adyacentes a las trabéculas óseas aumenta de 2-3 hasta 5 o más capas y se encuentran abundantes neutrófilos segmentados en las regiones intertrabeculares. No hay evidencia de displasia significativa. Los blastos suelen ser menos de 5% de las células de la médula ósea y no se encuentran en cúmulos. Si se observan más del 10% de blastos en médula ósea la enfermedad está progresando. La relación mieloides eritroides puede llegar a ser de 20 a 1; a pesar de ello la línea eritroide muestra maduración. En la mitad de los pacientes los megacariocitos se encuentran en números normales mientras que en la otra mitad hay un incremento en el número de ellos, normalmente se encuentran como enanos y son hipolobulados. Se llegan a encontrar histiocitos semejantes a los encontrados en la enfermedad de Gaucher (con citoplasma espumoso y citoplasma estriado). Se han encontrado fibrosis reticulínica hasta en el 40% de los pacientes al tiempo inicial del diagnóstico.

Se puede observar infiltración a bazo por granulocitos en diferentes estadios de maduración; de igual forma se puede observar un infiltrado semejante en los sinusoides hepáticos y en ganglios linfáticos.

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS BCR-ABL NEGATIVAS

Se ha observado que la mutación V617F de JAK 2 está estrechamente relacionada con este tipo de neoplasias. Algunas otras de las mutaciones que se han visto involucradas en estas neoplasias son las mutaciones en el exón 12. Recientemente se han encontrado otras mutaciones que incluyen a TET 2, ASXL 1, IDH1/2 , SRSF2 y CALR. Se ha observado que el microambiente proinflamatorio se debe a los productos formados por leucocitos y plaquetas y a la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Hay que recordar que la inflamación crónica depende de elevados niveles de citocinas, especies reactivas de oxígeno y quimiocinas.

En la actualidad se ha observado la presencia de enfermedades autoinmunes previas al desarrollo de neoplasias mieloproliferativas, entre estas enfermedades proinflamatorias se encuentran la enfermedad de Crohn, la polimialgia reumática, la púrpura trombocitopénica y la anemia aplásica. Se ha observado que ciertos haplotipos como el 46/1 se relacionan con enfermedad de Crohn y neoplasias mieloproliferativas.

POLICITEMIA VERA

La policitemia es un incremento de dos veces la desviación estándar para la edad, sexo y raza en los valores de hemoglobina (Hb), hematocrito o masa de células rojas. Es la más común de las neoplasias mieloproliferativas. La policitemia verdadera puede ser primaria, en la cual hay una hipersensibilización a los factores que normalmente regulan la cantidad de células rojas en sangre (como la EPO) o secundaria, en el cual hay un aumento en la EPO dependiente de la falta de oxígeno tisular o a una inadecuada secreción de la misma por un proceso neoplásico. La policitemia vera es una policitemia primaria adquirida con una incidencia anual de 1 a 3 por 100,000 habitantes. Es una proliferación clonal no solo de la serie eritroide

sino de los granulocitos y megacariocitos en la médula ósea (panmielosis) por lo que se encuentra leucocitosis y megacariocitosis en sangre. Las características clínicas se deben a trombosis y hemorragia (debidas a síndrome de von Willebrand adquirido por un defecto en la actividad del factor de von Willebrand). Las muestras de médula ósea se toman para confirmación del diagnóstico, obtención de material para estudios citogenéticos y establecer una muestra inicial para comparación en futuras muestras y evaluar progresión o respuesta a tratamiento.

Se describen clásicamente tres fases clínicas:

- 1) un fase prepolicitemica con eritrocitosis leve a moderada con trombocitosis prominente

- 2) una fase policitemica, en la cual se encuentra plétora yugular (80%), esplenomegalia (70%) y hepatomegalia (40%)

- 3) una fase postpolicitemica con metaplasia mieloide asociada a citopenias y mielofibrosis, se desarrolla en el 15 al 20% de los pacientes aproximadamente 15 años después del diagnóstico de policitemia. Se observa poikilocitosis y eritrocitos en forma de lágrima. Puede encontrarse osteoesclerosis. Se llegan a encontrar megacariocitos hipercromáticos con núcleos aberrantes de tamaños variables. Hasta el 90% de estos pacientes tienen un cariotipo anormal.

Pueden encontrarse proliferaciones blasticas hasta en el 2% de los pacientes y se puede relacionar a mielodisplasia en aquellas personas que reciben tratamiento; así como en pacientes de edad avanzada.

El encontrar 10% de blastos o más indica una transformación a una fase acelerada o mielodisplásica; mientras que el aumento a 20% de blastos CD34+ indica la progresión a una fase leucémica. La mayoría de los pacientes que desarrollan esta fase tienen anormalidades cromosómicas como pérdidas en el cromosoma 5 y 7.

Se denomina fase de gasto aquella en la que la policitemia y la panmielosis en la médula ósea llevan a una falla en la producción de células con la consecuente anemia

Los pacientes sin tratamiento mueren entre el año y los dos años; correctamente tratados (ya sea con flebotomías o hidroxiurea) llegan a vivir 15 años o más.

Los criterios de la OMS para el diagnóstico de PV se dividen en criterios mayores y menores, debiéndose cumplir los dos criterios mayores y uno menor o el primer criterio mayor y dos menores:

-Los criterios mayores incluyen: hemoglobina > 16.5 g/dL en hombres y >16 g/dL en mujeres u otra evidencia de aumento en el volumen de los eritrocitos (hemoglobina o hematocrito > al percentil 99 para la raza, sexo y edad, masa de eritrocitos >25% del valor predictivo medio o un aumento de 2g/dL en la basal de un individuo que no se asocia a corrección de deficiencia de hierro); y presencia de la mutación de JAK 2 V617F (presente en más del 95% de los casos) o una funcionalmente similar

- Los criterios menores son: biopsia de médula ósea con hiper celularidad con crecimiento trilineal (panmielosis) con proliferación prominente de las líneas eritroide, granulocítica y megacariocítica; eritropoyetina sérica en niveles menores a los de referencia y formación endógena de colonias eritroides in vitro.

En la médula ósea se observa una proliferación de los linajes eritroide, granulocítico y megacariocítico, con una celularidad media del 80% (que puede variar desde un 30% al 100%). Tradicionalmente no se observa un aumento en el porcentaje de mieloblastos. Los megacariocitos se encuentran dispersos y pueden ser de cualquier tamaño localizándose ocasionalmente adyacentes a las trabéculas óseas. Normalmente carecen de la atipia mostrada en la mielofibrosis primaria. Las tinciones de hierro se encuentran ausentes en el 90% de los casos. En 20% de los casos se observa aumento en las fibras de reticulina.

En el 10 al 20% de los pacientes se encuentran otras alteraciones cromosómicas asociadas a JAK 2 V617F como son: +8, +9, del(20q), del(13q) y del (9p)

En médula ósea los megacariocitos se agrupan densamente y sus núcleos pueden adoptar formas parecidas a nubes

MIELOFIBROSIS PRIMARIA (MFP)

La mielofibrosis es un aumento en la densidad de las fibras de reticulina que provén apoyo estructural a las células hematopoyéticas. Este incremento varía de ser focal a ser una red continua asociada a colágena y osteosclerosis. Se encuentra mediada por citocinas secretadas por las células de la médula ósea, especialmente los megacariocitos y las células del linaje de monocitos/macrófagos, así como de células estromales. La MFP es una neoplasia clonal mieloide caracterizada por la proliferación de granulocitos y megacariocitos así como un aumento en el tejido

conectivo de la médula ósea. Es la menos común y la más agresiva de las neoplasias mieloproliferativas

Se reconocen dos fases de la enfermedad:

-Fase prefibrotica o temprana: la médula ósea es hiper celular con ausencia o mínima fibrosis reticulínica y mínima hematopoyesis extramedular, acompañada de trombocitosis periférica. Suele encontrarse anemia moderada y leucocitosis, con trombocitosis moderada a grave.

- Fase fibrótica o tardía: la médula ósea hipocelular, con fibrosis reticulínica marcada y osteosclerosis, asociada a un aspirado de sangre periférica leucoeritroblastico y hepatoesplenomegalia por hematopoyesis extramedular. Los parámetros de sangre periférica encontrados en la fase prefibrótica empeoran en esta fase; se presenta la leucoeritroblastosis y los eritrocitos en forma de lagrima con plaquetas anormales, y se han correlacionado con la salida de precursores de sitios de hematopoyesis extramedular a sangre periférica. Cuando los blastos llegan a más del 20% se debe de hacer el diagnóstico de leucemia aguda o de progresión a una fase leucémica.

Las factores profibroblasticos son principalmente el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento transformante B que son sintetizados por los megacariocitos y plaquetas. De igual forma hay neoangiogenesis que se relaciona con el grado de fibrosis y hematopoyesis extramedular. Otras citocinas que se han visto aumentadas son la proteína inflamatoria del macrófago 1B, los inhibidores de metaloproteinasas de tejido, el factor de crecimiento similar a la insulina 2 y el factor de necrosis tumoral alfa1.

Aproximadamente 50% de los pacientes tienen la mutación V617F de JAK2. En 5% el gen que codifica al receptor de trombopoyetina se encuentra alterado.

Los criterios diagnósticos para la mielofibrosis primaria son:

Criterios mayores: Presencia de la proliferación de megacariocitos y atipia, usualmente acompañada de fibrosis reticulínica o de colágena y en ausencia de fibrosis reticulínica significativa los cambios en los megacariocitos se deben de acompañar de incremento en la celularidad de la médula ósea caracterizada por la proliferación granulocítica y frecuentemente eritropoyesis disminuida; no cumple criterios de policitemia vera, leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva, síndrome mielodisplásico u otra enfermedad de la línea mieloide; demostración de la mutación JAK2 V617F, CALR o MPLu otro marcador clonal; y en los casos en que haya ausencia de marcadores clonales demostrar que la mielofibrosis no es secundaria a infección, enfermedad autoinmune, o una condición crónica inflamatoria, leucemia de células peludas u otra neoplasia linfóide, metástasis o mielopatías tóxicas crónicas.

Criterios menores: Leucoeritroblastosis, aumento en el nivel de lactato deshidrogenasa sérico, anemia y esplenomegalia palpable

En la médula ósea siempre se debe de evaluar la presencia de fibras de reticulina. Se debe realizar inmunomarcaje para neoangiogenesis como CD34 (la cual ayudará también al conteo de blastos). En la etapa prefibrotica hay hiper celularidad así como aumento en el número de neutrófilos con disminución e inmadurez en los eritrocitos. Los megacariocitos son anormales en forma y lugar, lo cual es útil para distinguir la MFP de la TE. Los megacariocitos van de pequeños a grandes con la relación núcleo citoplasma anormal y lobaciones en forma de nube o globo. Se ha visto que

en algunas ocasiones los linfocitos T y B derivan de un clon neoplásico. Conforme la MFP progresa la celularidad va disminuyendo y aumenta la fibrosis; a pesar de esto los megacariocitos aberrantes se siguen observando. La MFP en el estadio fibrótico no puede ser distinguida de la mielofibrosis post PV o postTE por morfología. Una fase acelerada se presenta al encontrar del 10 al 19% de blastos y una transformación a leucemia al ser estos últimos mayores al 20% de las células. La evolución a una transformación blástica ocurre en 5 al 20% de los pacientes con una media de tres años de evolución y se ha asociado a evolución cariotípica.

En médula ósea se han demostrado megacariocitos dispuestos en nidos con nucleos en forma de asta de venado con dilatación sinusoidal y hematopoyesis extrasinusal

Los sitios más frecuentemente afectados por la hematopoyesis extramedular suelen ser el hígado y el bazo, pero cualquier otro órgano lo puede hacer. El hígado puede mostrar fibrosis y cirrosis.

Los factores pronósticos más importantes al momento del diagnóstico incluyen anemia (Hb <10g/dL), edad mayor a 65 años, leucocitosis >30 x 10⁹/L y anomalías citogenéticas La expectativa de vida en la fase fibrótica es de 5 años y en la fase prefibrótica va de 10 a 15 años.

TROMBOCITEMIA ESENCIAL (TE)

Se presenta hasta en 2.5 personas por cada 100,000 habitantes, en pacientes normalmente mayores en la sexta década de la vida. Hasta el 50% de los pacientes se encuentran asintomáticos al momento del diagnóstico.

Es una enfermedad con una elevada cuenta plaquetaria que involucra al linaje megacariocítico y se caracteriza por una trombocitosis >450 x 10⁹/L en sangre

periférica, megacariocitos maduros en médula ósea y episodios de trombosis o hemorragia. La mutación V617F de JAK2 se encuentra en 50% de los casos. La trombopoyetina tiene un rol central en la maduración, supervivencia y proliferación de los megacariocitos. En la TE hay una activación constitutiva sin necesidad de TPO lo que lleva a la señalización por medio de STAT 5, PI3K y MAPK.

Los criterios diagnósticos son: cuenta plaquetaria $<450 \times 10^9/L$, una biopsia de médula ósea con proliferación principalmente en el linaje megacariocítico, con megacariocitos alargados y maduros con una leve desviación a la izquierda en la granulopoyesis o eritropoyesis; que no cumpla criterios para PV, MFP, LMC BCR-ABL+, síndrome mielodisplásico u otra neoplasia mieloide; sin evidencia de trombocitosis reactiva o demostración de la mutación JAK2 V617F.

En sangre periférica se observan plaquetas atípicas que van desde gigantes hasta hipogranulares, no se observan células en forma de lagrimea. La médula ósea es normocelular o ligeramente hiper celular, con aumento en el número y tamaño de los megacariocitos, normalmente grandes, hiperlobulados con aspecto de cuerno de alce. El aumento de granulocitos es raro. Las fibras reticulínicas normalmente no se encuentran aumentadas en número. Puede haber emperipolesis. El aumento en el tamaño del bazo se debe a secuestro plaquetario.

Los megacariocitos tienen núcleos de tamaño grande, multinucleados con apariencia de astas de ciervo y tienen citoplasma amplio.

CINASAS JANUS (JAK)

Las JAK son tirosina cinasas que participan como receptores de superficie celular, se localiza en el cromosoma 9p24 e incluye 25 exones; la proteína es de 1132

aminoácidos. Hay 4 miembros de la familia de JAK: JAK 1, JAK 2, JAK 3 y TYK 2. La primera en ser descrita fue la cinasa TYK 2. La mitad aminoterminal de las JAKs contiene dos motivos, uno con homología Src-2 (SH2) y uno de banda ezrina, radixina, moesina y cuatro-punto-uno (FERM). Al contrario de otras proteínas el dominio SH2 de las JAK no parece unirse a residuos fosfotirosina. El dominio FERM regula la actividad catalítica y media la asociación con los receptores y con otras proteínas; si hay alteraciones en este dominio hay una activación constitutiva de la cinasa en ausencia de la estimulación de citocinas. Los residuos localizados en esta región se unen a la región box1/prolina de los receptores de citocinas. La característica principal de las proteínas JAK son dos dominios de homología Jak (JH 1 y 2) que tienen una homología a los dominios tirosina cinasa. La presencia de estos dos dominios de tirosina cinasa hacen que estas proteínas se nombren a partir del dios romano de dos caras Janus. El motivo JH 2 es el encargado de la regulación en la actividad de las proteínas JAK y en la señalización de las citocinas que se unen a receptores tipo I y tipo II. Se ha observado que los ratones con delección de JAK2 tienen un fenotipo letal causado por el bloqueo definitivo de la eritropoyesis pero con un desarrollo linfoide intacto.

Aunque clásicamente se ha involucrado a las JAK en la activación de las Stat se han visto otras funciones para estas proteínas, como la activación de la cinasa Pyk2, la estimulación de la vía Ras-MAPK, la inducción de c-fos y c-myc.

Stats

Los STATs son factores de la transcripción que se activan por citocinas y factores de crecimiento. En la actualidad 7 genes codificadores de STAT se han identificado. Como la mayor parte de los factores de transcripción los STATs exhiben una

estructura modular de 7 dominios bien definidos, incluyendo un dominio conservado N terminal, un dominio de unión a DNA, una región de unión, un dominio SH2, un dominio de activación de tirosina y un dominio de transactivación C terminal. El dominio SH2 es el mejor conservado entre los que conforman los STATs y es requerido para la homodimerización y heterodimerización lo cual es vital para traslocarse a núcleo y unirse a DNA. El complejo compuesto por STAT 1, STAT2 y factor regulatorio de IFN (IRF)9 se une al elemento de respuesta de IFN alfa/beta. La estimulación por citocinas induce fosforilación de los residuos de tirosina en el receptor lo cual une a los STATs por sus dominios SH2. Una vez unidos los miembros de la familia STAT se fosforilan en respuesta a la estimulación de citocinas en una tirosina conservada en el extremo carboxi terminal. Lo cual provoca la heterodimerización de la proteína y su posterior traslocación al núcleo. Se han propuesto dos vías de activación para los STAT, una que es dependiente de JAK y otra que depende de otras tirosin kinasas. Se ha observado que la traslocación al núcleo de los diferentes Stats es necesaria para la transcripción de diversas citocinas. Por ejemplo, la disfunción de Stat 5^a y 5^b afecta la producción de IL2, IL3, el factor estimulante de colonias granulocítico mononucleares y el factor estimulante de colonias granulocíticas.

Para la activación de los Stats, se requiere de la unión de diversas citocinas a su ligando con la posterior activación de las Jaks. Las Jaks son las responsables de la fosforilación del receptor creando sitios de unión para los Stats, los cuales pueden ser fosforilados por las proteínas Jak en el extremo C- terminal.

Se ha visto que puede haber algo de activación independiente de las vías dependientes de JAK.

Se han identificado mecanismos de retroalimentación negativa en el control de la activación de las vías de JAK-Stat; algunos de ellos son la degradación endosomal de los complejos JAK/receptor a través de endocitosis, la presencia de fosfatasas y algunas proteínas que se unen a Stats e inhiben su unión a DNA conocidas como PIAS

JAK 2

Las mutaciones en JAK 2 son uno de los criterios mayores para el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas en la clasificación de la OMS; la mutación común es el cambio de una valina por una fenilalanina en el codón 617 (V617F), la cual fue descubierta en 2004 y sus primeros reportes aparecen en 2005 que causa una alteración en el dominio autoinhibitorio de la JH2, esto como resultado de una mutación somática de un cambio de nucleótido (G por T) lo que conduce al cambio de una valina por una fenilalanina en el codón 617. Se han identificado otras mutaciones en los codones 12 y 14 como sustituciones, pequeñas deleciones o duplicaciones de secuencia . Se han reportado distintos métodos para el análisis de las mutaciones en JAK2 como son la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación o las reacciones en cadena de polimerasa (PCR) alelo específicas que buscan una sola mutación. La curva MELT de alta resolución es un método que sirve para la búsqueda de diversos polimorfismos y mutaciones somáticas. Para su diagnóstico y caracterización se pueden utilizar muestras en fresco y embebidas en parafina . En los pacientes con mutaciones V617F en JAK 2 tienen un dominio JH2 que no cumple su función inhibitoria sobre JH 1, el cual se encuentra activo y realiza funciones biológicas sobre la célula, llevando a la activación de STAT 3 y 5. Se ha observado que la deleción de Stat 5 previene el desarrollo de neoplasias

mieloproliferativas dependientes de la mutación Jak2V617F y no es indispensable en la hematopoyesis normal; sin embargo la delección de STAT 3 lleva a estados mieloproliferativas; por lo que estos hallazgos subrayan la importancia de Stat 5 en la patogénesis de las neoplasias mieloproliferativas y muestran un rol supresivo para Stat 3. En la actualidad se ha observado la activación de vías no canónicas en la señalización de JAK 2.

La señalización de IL3 es dependiente de la activación de JAK2 y el receptor de IL3 se expresa en poblaciones de células hematopoyéticas como los receptores de TPO, MPL por lo que estas citocinas pueden ser ejes importantes en la señalización de JAK2 en neoplasias mieloproliferativas. En el estudio de Vu et al se identificó que la señalización por receptor de IL 3 no es necesaria para la formación de neoplasias hematopoyéticas y sugieren que TPO es la citocina eje en la enfermedad.

Algunas de las citocinas que requieren de JAK 2 para la traducción de señales son: EPO, TPO, IL3, IL5, GM-CSF, HG, leptina, prolactina, IL23, IL12, IFN gamma y GCSF.

La mutación JAKV617F es la mutación más frecuente que se encuentra en las neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL negativas. No se ha demostrado en pacientes con neoplasias linfoides, en proliferación reactiva de células mieloides o en voluntarios sanos. Es altamente probable que el numero de copias del gen de JAK2 mutado están íntimamente relacionadas con la patología, esto se ha deducido por la frecuencia de trisomía 9 y perdida de la heterocigosidad en el mismo cromosoma; ya que es la recombinación mitótica se permite la duplicación del gen mutado de JAK 2 y la eliminación de JAK 2 wild type, y cada ciclo de recombinación llevara a un incremento en la activación espontanea de JAK 2. Se ha demostrado

en ratones a los que se ha transferido célula madre con la mutación de JAK 2 que esta es suficiente para generar neoplasias mieloproliferativas.

JAK 2 EN POBLACIÓN MEXICANA

Las neoplasias mieloproliferativas son menos frecuentes en pacientes mexicanos que en pacientes caucásicos. En el estudio de Argüelles et al se observó la presencia de la mutación de JAK en 4 de 6 pacientes con policitemia vera, en 1 de dos pacientes con trombocitemia primaria y el 1 paciente 1 analizado como mielofibrosis primaria y todos los pacientes con cromosoma Philadelphia positivos fueron negativos a esta mutación, lo cual es congruente con lo publicado en la literatura global

VALOR DE JAK 2 EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

En la actualidad las líneas de tratamiento para las neoplasias mieloproliferativas incluyen agentes citoreductores como la hidroxiurea y una molécula inhibidora de JAK 1 y 2 denominada Ruxolitinib. En el caso del Ruxolitinib solo el 22% de los pacientes tratados muestra mejoría clínica, no demostrándose una remisión parcial o completa de la enfermedad. El microambiente generado por la activación constitutiva de la cinasa también es uno de los principales puntos en la investigación farmacológica, ya que las diversas citocinas pueden ser blancos terapéuticos.

MICROAMBIENTE

El microambiente incluye células como fibroblastos, células endoteliales, células de la respuesta inmune; en médula ósea incluye osteoblastos, adipocitos y células hematopoyéticas; así como matriz extracelular. Este ambiente es capaz de

proveer soporte físico así como una serie de factores solubles que sirven para el crecimiento y diferenciación de las diferentes células (tanto neoplásicas como no neoplásicas). El soporte físico se da a través del contacto célula a célula y viene de la interacción de varias proteínas extracelulares como caderinas y receptores de factores de crecimiento. Los factores solubles o paracrinos incluyen una combinación de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Se ha visto que el microambiente es capaz de promover el crecimiento de una neoplasia y también actúa a favor o en contra de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, se ha visto que el Ruxolitinib cuando es dado en cultivos con células estromales junto con células neoplásicas no es capaz de inhibir de manera adecuada a las células con mutaciones de JAK 2.

CITOCINAS

La inflamación crónica es la responsable de los síntomas constitucionales que afectan negativamente la calidad de vida de los pacientes, como la aterosclerosis prematura y la progresión de la enfermedad

Las citocinas son proteínas que se unen a sus receptores y activan eventos de señalización intracelular que llevan a la modulación de la expresión génica. La mayoría de los receptores de citocinas están compuestos por complejos de subunidades, normalmente una que se une al ligando y otra que transduce señales; estas últimas formando por similitud familias de receptores. La interacción de las citocinas con sus ligandos lleva a la fosforilación del receptor y de varias proteínas intracelulares. Se ha demostrado que los miembros de la familia de cinasas Janus (JAK) median las señales que activan las citocinas.

Generalmente la dimerización/oligomerización de los receptores por la unión de su ligando lleva a la yuxtaposición de las JAKs, lo que lleva a su fosforilación con aumento de su actividad. Esto permite la unión de los traductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), cinasas Src, fosfatasa, Shc, Grb2 y Pi3 cinasa. Este modelo de unión a dominios aplica para receptores de cadena simple como los que utilizan EPO y G-CSF.

CITOCINAS Y NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Los pacientes con neoplasias mieloproliferativas tienen niveles circulantes elevados de citocinas proinflamatorias y estos niveles elevados se relacionan con una supervivencia menor en mielofibrosis. El concepto de las citocinas contribuyendo a fibrosis, angiogénesis y osteosclerosis/osteopenia se encuentra bien establecido. Se ha considerado a las citocinas como las responsables de los síntomas sistémicos, de la fibrosis en médula ósea, de la hematopoyesis extramedular y de la progresión de la enfermedad. La terapia con ruxolitinib se ha asociado a una disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias, sin embargo, el rol de las citocinas en la patogénesis de la mielofibrosis y en la respuesta a inhibidores de JAK aún no se ha descrito por completo. Se han identificado niveles aumentados de IL 6, CXCL9 y CCL2 en sangre periférica. Se ha demostrado también que el porcentaje de células en médula ósea secretando por lo menos una citocina es mayor en pacientes con mielofibrosis que en los controles sanos. Las células de mielofibrosis por lo general co-secretan más de una citocina, al contrario de las células normales que secretan menos de 2 citocinas; siendo comunes la secreción de CCL3, CCL4 y TNF alfa; así como IL 6, IL 12, IL 10, CCL2, CCL 5, CXCL 9 y

CXCL 1. Se ha observado que no solo las células neoplásicas contribuyen a la secreción de las citocinas, sino también las células mieloides maduras (TNF alfa y CCL3) y las células progenitoras (IL 6 e IL10). Se ha comprobado por inmunohistoquímica la secreción aumentada de IL8 en cortes de médula ósea con mielofibrosis. En modelos murinos se ha visto que ratones deficientes de IL6 mantienen elevadas las citocinas proinflamatorias con un incremento compensatorio de IL 4 e IL5; sin embargo la delección de STAT 3 y la inhibición de JAK 1/2 reduce la producción de citocinas y disminuye la mielofibrosis. Los estudios de expresión de mRNA en células neoplásicas y no neoplásicas ha revelado que ambas poblaciones son productoras de citocinas inflamatorias. Sin embargo en leucemia mieloide crónica se ha visto que los niveles de linfocitos T productores disminuyen la producción de INF gamma, TNF alfa, IL 2 e IL 4 se encuentran disminuidos en pacientes comparados con controles sanos; sin embargo después del tratamiento los niveles de células productoras de IFN gamma e IL 2 aumentan. En el caso de la PV se ha demostrado un aumento en los niveles circulantes de IL11 e IL8. En 2005 Panteli et al demostraron un aumento en la IL2 y en el receptor soluble de la misma. En este mismo estudio no se encontraron diferencias entre los controles sanos y los pacientes con respecto a los niveles de IL 1 alfa e IL1 beta, pero se encontró un aumento en la TPO. En 2011 Tefferi et al encontraron un aumento significativo en IL10, IL12, IL13, TNF alfa e INF alfa así como IL 1 alfa e IL 1 beta, G-CSF, HGF Y VEGF. En experimentos posteriores este mismo autor validó los resultados de este estudio. Vaidy encontró un aumento en IL 5, IL 6, IL7, IL 8, IL 12, IL 13, GM-CSF, MIP 1. Se encontró que RANTES era menor en los pacientes con policitemia vera que en los controles. Vaidya encontró diferencias

entre la expresión de citocinas en PV y MFP, siendo IL7, IFN gamma, GMCSF, MIP 1 alfa y VEGF mayores en la primera e IL 1 beta, IL1 RA, IL 2 R, EGF, IL10 y b-FGF, IL 12, IFN alfa y RANTES mayores en la segunda. En el estudio de Pourcelot se observó un aumento en la IL 4, IL8, GM CSF, INF gamma, MCP 1, PDGF y VEGF en la trombocitosis esencial comparada con la policitemia vera. Gangemi evaluó IL 23 la cual se encontró elevada en pacientes con PV comparados con los controles. Para tratar de explicar la mielofibrosis en médula ósea se han relacionado dos citocinas: PDGF y TGF beta 1 así como sus receptores.

Otras citocinas que se han encontrado aumentadas en sangre periférica de los pacientes es IL1 e IL2. Se ha observado que niveles aumentados de IL8, IL 2R, IL 12 e IL15 son factores predictivos de menor supervivencia, La sobrevida libre de leucemia con IL8 e IL2R.

Los síntomas constitucionales también se han correlacionado con ciertas citocinas: se ha observado un aumento en la necesidad de transfusiones en aquellos pacientes con niveles elevados de IL 12 e IL2 R; la IL8 e IL 2R con leucocitosis; HGF, MIG e IL1RA con esplenomegalia e IL1RA, IL2R e IP10 con JAK2V617F Los interferones de tipo 1 y tipo 2 se relacionan con trombocitosis.

No sólo hay un aumento en el número y cantidad de citocinas circulantes, también se puede observar una respuesta anómala a algunas de ellas. En la policitemia vera una fracción de precursores de serie roja es capaz de proliferar sin eritropoyetina. Hay una hipersensibilización a factores de crecimiento como IL3, factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de células madre, factor estimulante de colonias granulocito mononucleares y EPO. De manera semejante en la

trombocitosis esencial y en mielofibrosis primaria los progenitores reaccionan de manera aumentada a la trombopoyetina.

Se ha propuesto que las citocinas que median la inflamación crónica en neoplasias mieloproliferativas llevan a la evolución clonal y a las consecuencias de esta enfermedad, como segundas neoplasias y aterosclerosis prematura. Algunos grupos han propuesto que la utilización de inhibidores selectivos de JAK2 asociado a medicamentos antiinflamatorios podrían ser capaces de disminuir las consecuencias y progresión de la enfermedad.

La evidencia demuestra que la producción de todas estas citocinas no está conformada solamente por la clona celular neoplásica primaria, sino también por la inflamación secundaria y una producción alterada de citocinas.

En la revisión realizada por Hasselbach et al, se observó que los paneles de citocinas estudiados y las citocinas que se han encontrado elevadas en los diferentes estudios han mostrado inconsistencias. El propone la estandarización de los métodos para comparar la producción de citocinas en las diferentes cohortes de pacientes con neoplasias mieloproliferativas.

Los estudios que se han hecho en pacientes postrasplantados de médula ósea han demostrado una disminución en la producción de metaloproteinasas y PDGF α las cuales correlacionan con la remodelación de médula ósea y la remisión hematológicas

CITOCINAS Y MIELOFIBROSIS

La fibrosis se considera un proceso reactivo que se asocia a remodelación y reparación del tejido, este evento está caracterizado por un aumento en la actividad de los fibroblastos y de células del tejido conectivo; para su formación se requiere

de la producción de factores de crecimiento, de enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogenicas que cambia el depósito de los elementos de tejido conectivo. Un hecho común en las neoplasias mieloproliferativas es la presencia de mielofibrosis en médula ósea. En la actualidad el mecanismo por el cual hay formación de mielofibrosis no se ha entendido completamente. Se ha estudiado que ciertas citocinas se encuentran asociadas a la formación de la fibrosis. Nakayama et al encontraron un aumento en los mastocitos en médulas óseas que eran positivas para TGF beta e IL13. La positividad para TGF beta también se encontró en megacariocitos.

Se ha observado que la activación de las vías JAK-STAT (por ejemplo en la mutación V617F) hacen malfuncionar la regulación del microambiente en médula ósea, con la formación de las citocinas antes citadas, siendo la más importante para la supervivencia de fibroblastos y células endoteliales de vía de JAK/STAT3

El TGF beta es una citocina pleiotropica producida principalmente por megacariocitos que estimula a los fibroblastos a proliferar y producir proteínas de matriz extracelular como colágena tipo I, III y IV; también aumenta la expresión de proteasas que inhiben a las enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular; siendo producida por linfocitos T reguladores. Se ha visto que otras células, como las células cebadas, son capaces de producir TGF beta e IL13.. La IL13 se ha implicado de las siguientes maneras en la producción de la fibrosis: directamente activando fibroblastos, regulando la actividad de la arginasa en macrófagos, aumentando la síntesis de L-ornitina desde la L-arginina promoviendo la proliferación fibroblastica y la fibrosis.

Otras citocinas que se han visto implicadas en el desarrollo de mielofibrosis es la IL8, la oncostatina M, lipocalina 2, PDGF, FGF, VEGF e inhibidores de metaloproteinasas de matriz; las cuales se han visto elevadas en sangre periférica de pacientes con mielofibrosis.

CITOCINAS DE PERFILES TH1, TH2 Y TH17

Desde hace algunas décadas se observó que los linfocitos T cooperadores son capaces de producir citocinas. Estas citocinas son producidas por ciertos subgrupos de linfocitos T cooperadores conocidos como TH1, TH2 y TH17 (no restringiéndose solo a estos, pero si siendo los más estudiados). Estos subgrupos de linfocitos T son inducidos por citocinas presentes en el medio, comprometen su diferenciación y producción de proteínas y amplifican una respuesta determinada.

Cada uno de estos subgrupos tiene un perfil de citocinas característico, mientras que las respuestas TH1 aumentan la fagocitosis, los TH2 aumentan la cantidad de eosinófilos en sangre periférica y los TH17 aumentan la cantidad de neutrófilos absolutos. Todas estas acciones son determinadas por la expresión de factores de transcripción que evitan que las demás respuestas se activen y que haya producción de otro tipo de citocinas.

En el caso del perfil TH1 hay una expresión de los factores de transcripción STAT 1, STAT4 Y T-bet, lo cual llevara a la producción de INF gamma, TNF e IL10. Un medio rico en IL12 e IL18 son capaces de producir este subgrupo de linfocito.

Para la respuesta TH2 hay una expresión de STAT 6 y GATA3, lo cual lleva a la presencia en el medio de IL4, IL5 e IL13. Y para la respuesta TH17 encontramos la producción de IL22 e IL17 a través de las acciones de STAT3 y ROR γ T.

¿PORQUÉ LAS CITOCINAS DE ESTOS PERFILES Y NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS?

Se ha observado que las neoplasias mieloproliferativas tienen un aumento en la expresión de STATs (en especial la 1, 3 y 5). Debido a esto el estudio de las citocinas producidas en neoplasias mieloproliferativas agrupadas en los perfiles de los subgrupos de linfocitos T cooperadores podría ayudarnos a observar si alguno de estos microambientes se encuentra aumentado y tratar de relacionarlo con la respuesta clínica y factores de mal pronóstico de la enfermedad

EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS EN MÉDULA ÓSEA:

La fibrosis de médula osea se encuentra caracterizada por el incremento en el deposito de fibras de reticulina y de colágena. La mielofibrosis puede existir de manera primaria o con una enfermedad coexistente. La mielofibrosis es una condición letal en la actualidad que no tiene un tratamiento efectivo.

En la actualidad se utilizan dos escalas para la medición de la fibrosis en médula ósea:

1) CUANTIFICACIÓN DE LA RETICULINA Y COLAGENO EN MÉDULA ÓSEA (MODIFICADA DE BAUERMEISTER)

0	Sin fibras demostrables
1	Fibras ocasionales finas o un foco con una red de fibras finas
2	Una red de finas fibras en la mayor parte del corte, sin fibras gruesas

3	Una red difusa de fibras, con algunas fibras gruesas, pero sin colágena madura (tinción de tricrómico negativa)
4	Una red de fibras gruesas difusa con áreas de colagenización (tinción de tricrómico positiva)

2) Consenso europeo para la gradificación de la fibrosis en médula ósea:

0	Fibras de reticulina sin intersecciones correspondientes a médula ósea normal
1	Una red laxa de fibras reticulínicas con muchas intersecciones especialmente en áreas perivasculares
2	Aumento difuso y denso en la reticulina con intersecciones extensas, ocasionalmente con colágena u osteosclerosis focal
3	Aumento difuso y denso de las fibras de reticulina con extensas intersecciones , colágena y osteosclerosis significativa

En el presente trabajo se utilizara la clasificación modificada de Bauermeister para la evaluación de la mielofibrosis

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA:

Como se puede observar, en México hay una falta de estudios en relación a las neoplasias mieloproliferativas, por lo que es necesario el estudio de estas enfermedades, así como la caracterización de sus alteraciones genéticas así como del microambiente celular, para verificar los resultados escritos en otras poblaciones.

Debido a esto, nos dimos a la tarea de describir los hallazgos más frecuentes en las médulas óseas de estos pacientes (celularidad, relación entre series granulocítica y eritroide, mielofibrosis, cantidad de megacariocitos presentes), así como verificar la presencia de la mutación JAK 2 V617F, y la búsqueda de fragmentos de DNA correspondientes a citocinas.

JUSTIFICACIÓN:

El Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán” al ser un hospital de referencia cuenta con el material biológico necesario para realizar las investigaciones necesarias en el país referentes a este tipo de neoplasias, que en población general y en otros ambientes hospitalarios serían raras de ver.

Esta investigación tiene como objetivos comenzar con el estudio del microambiente en este tipo de neoplasias en poblaciones mexicanas.

HIPOTESIS:

Las neoplasias mieloproliferativas presentaran un microambiente diferente dependiendo de la entidad clínica particular, lo cual dará diferentes características a nivel de médula ósea, expresión de citocinas y clínica de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Retrospectivo

Se realizó una búsqueda en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de los años comprendidos entre 2005 y 2015 (92512 reportes en total), en un primer filtro se seleccionaron aquellas médulas óseas cuyo resultado diagnóstico fue:

- Compatible con neoplasia mieloproliferativa o síndrome mieloproliferativo
- Infiltrado por neoplasia mieloproliferativa o síndrome mieloproliferativo
- Sugerente de neoplasia mieloproliferativa o síndrome mieloproliferativo
- Cambios proliferativos de la serie granulocítica/mieloide/megacariocítica/eritroide

Se recabó 286 reportes con los criterios anteriores, de los cuales 148 reportaron hallazgos sugerentes de policitemia vera, mielofibrosis primaria y trombocitemia esencial; 138 fueron compatibles con leucemia granulocítica crónica, leucemia mielomonocítica crónica o síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo. Se obtuvieron los nombres y registros de los pacientes para la búsqueda intencionada de información clínica.

Debido a las características de nuestro estudio se excluyeron de la muestra aquellos pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo y leucemia mielomonocítica crónica.

En el segundo filtro se realizó la búsqueda en el archivo electrónico de los pacientes previamente seleccionados (286) a aquellos que tuvieran el diagnóstico clínico de

policitemia vera, trombocitosis esencial, mielofibrosis primaria y leucemia granulocítica crónica; Además se identificó si contaban con estudio de la mutación para JAK2 V617F. De aquellos pacientes que el diagnóstico clínico e histopatológico fue concordante para policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis primaria se encontró lo siguiente:

- 20 pacientes con policitemia vera
- 12 pacientes con mielofibrosis primaria
- 34 pacientes con trombocitosis esencial
- 1 paciente con diagnóstico de mielofibrosis primaria vs trombocitemia esencial

En un tercer filtro se consideró que el material biológico existiera en el archivo de patología (laminillas y bloques de parafina), pudiéndose recuperar:

- 11 casos de policitemia vera
- 7 casos de mielofibrosis primaria
- 23 casos de trombocitosis esencial
- 1 caso de mielofibrosis primaria vs trombocitemia esencial

Estos casos se dividieron en pacientes en los que teníamos el antecedente de mutación de JAK2 positiva o desconocida, por lo que se agruparon de la siguiente manera:

Mutación JAK2 V617F previa conocida:

- 5 casos de policitemia vera
- 11 casos de trombocitosis esencial
- 1 caso de mielofibrosis primaria vs trombocitemia esencial

Mutación JAK2 V617F desconocida:

- 6 casos de policitemia vera
- 12 casos de trombocitosis esencial

Los casos de mielofibrosis primaria ninguno contaban con reporte previo de la mutacion para JAK2.

Como grupo control se seleccionaron 16 casos con diagnóstico clínico e histopatológico de leucemia granulocitica crónica, y que existiera material suficiente (bloques y laminillas) para su estudio.

OBTENCION DE LA MUESTRA:

Se recibieron muestras en solución fijadora de Bouin, posterior a su lavado se descalcifican con solución de ácido nítrico al 5% durante 4 horas, posterior a esto se lava con agua destilada, para posteriormente ingresar a una solución basificada (agua destilada+ bicarbonato de sodio) durante 5 minutos. Posteriormente, se lava con agua destilada y se fija en formol al 10%

BLOQUES DE PARAFINA:

Para la inclusión en parafina el tejido es encapsulado y pasa por las siguientes soluciones:

Alcohol al 80% durante 2 horas

Alcohol al 96% durante 2 horas

Alcohol-xilol durante 2 horas

Xilol durante 2 horas

Alcohol al 100% durante 2 horas

Parafina durante 2 horas

TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

Se sumergen los preparados histológicos (3 mm) en xilol para eliminar los excesos de parafina. Luego pasan por una serie de alcoholes (100°, 95° y 70°). Se lava en agua para eliminar exceso de alcohol. Se sumerge en hematoxilina por 10 minutos, luego se lava en agua para eliminar excesos y se pasa rápidamente por alcohol ácido. Se lava nuevamente. Se sumerge 30 segundos en eosina. Se pasa por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70°, 95° y 100°). Finalmente se deja remojar 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final

TINCIÓN PARA FIBRAS RETICULINICAS (TINCION DE WILDER)

Los preparados histológicos se sumergen en xileno, alcohol absoluto, alcohol al 95% y agua destilada. Se lavan bien con agua destilada. Posteriormente se agrega solución de ácido fosfomolibdico por 1 minuto. Se lava nuevamente por 10 a 20 segundos. Se sumerge en solución de plata amónica por 1 minuto. Se sumerge rápidamente en alcohol 95% y se para a solución reductora por 1 minuto. Se lava con agua destilada. Se tiñe con solución de cloruro de oro por 1 minuto hasta que el color pase a lavanda. Se lava con agua destilada. Se pone en solución de tiosulfato al 5% durante 1 a 5 minutos. Se lava nuevamente. Se contratiñe con hematoxilina y eosina. Se pasa por alcohol al 95%, alcohol absoluto, xileno y se monta.

Inmunohistoquímica para CD117 y CD34

Para realizar inmunohistoquímica se realizan cortes del tejido de 2m y se colocan en laminillas electrocargadas (Bio-CARE) se incuban a 56°C por 30 minutos o hasta observar eliminación de parafina, se pasa por 2 baños de xileno, 1 baño de Xileno-

alcohol etílico, 2 baños de etanol etílico, un baño de alcohol etílico 96% y finalmente agua destilada.

Se realiza exposición de los sitios antigénicos, en un vaso de Coplin se coloca solución recuperadora de buffer citrato (pH bajo), se incuban en olla express por 15 minutos, se deja atemperar y se enjuaga con agua destilada se coloca en el sistema de capilaridad (Shandon). Para el desarrollo de la inmunohistoquímica se utiliza el sistema de Bio-SB (Santa Barbara, CA, USA). El cual cuenta con una solución bloqueadora universal (bloqueo de sitios inespecíficos) por 5 minutos a temperatura ambiente se enjuaga con amortiguador de lavado 3 minutos (todos los lavados se realizarán con este amortiguador) se coloca 100 μ l del anticuerpo para CD117 biotina (marca Bio-CARE CN084C dilución 1:200) y CD34 biotina (marca Bio-CARE, e conejo clona YR143, dilución 1:250), se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente, enjuagar por 3 minutos, adicionar 100 μ l de la solución de estreptoavidina, e incuba 10 minutos y se enjuaga se colocan 100 μ l de la solución HRP-biotina, incubar 10 minutos finalizado este tiempo se enjuaga y se retiran del sistema de capilaridad y se adicionan 100 μ l de DAB-H₂O₂ y se deja revelar por 10 minutos verificando en el microscopio el desarrollo de color, se enjuaga con agua destilada, se contrasta con Hematoxilina se cubre con resina y un cubreobjetos. Se deja secar y se evalúa al microscopio de campo claro.

PCR tiempo real para JAK-2 V617F

Para la evaluación del gen JAK-2 V617F, utilizamos ADN el cual se extra de los bloques de parafina para esto es necesario limpiar con solución RNaseZAP al microtomo y el bloque de parafina, si el bloque de parafina contiene tejido de 1 cm²

se toman 8 \square m de tejido y se colocan dentro de un tubo nuevo y estéril de polipropileno de 1.5 ml. El tejido es hidratado con 2 baños de xilol, 2 baños alcohol etílico absoluto, se elimina el sobrenadante y se deja secar el boton a temperatura ambiente por 15 min.

El tejido se hidrata con buffer Tris-Hcl, se adiciona 60 μ l de proteinasa K e incubar toda la noche a 37°C, para llevar acabo la extracción de ácidos nucleicos se adiciona 500 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico se homogeniza y centrifugar a 14000rpm por 10 min, la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo de polipropileno y adicionar 500 μ l cloroformo-alcohol isoamilico se homogeniza y centrifugar a 14000rpm, la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo de polipropileno el cual contiene etanol etílico y acetato de sodio e incubar por 1 hr a -20°C. El tubo se centrifuga a 14000rpm, el sobrenadante se elimina y se lava el botón con etanol al 70%. Centrifugar a 14000rpm eliminar el sobrenadante y el boton se seca a temperatura ambiente por 10 minutos y resuspende en 50 μ l de agua e incubar por 1 hr a 37°C, cuantificar en un nanodrop tomar lectura de A260, A280 para calcular concentracion y pureza.

Concentracion para DNA:

$$50 \times \text{lectura de A260} = \text{concentracion en nanogramos}/\square$$

Pureza

$$A260/A280 \geq 1.8 \text{ hasta } 2.5$$

Evaluación de calidad

Se realiza un PCR de gen constitutivo en base a BIOMED2. utilizando 100 ng de DNA, los cuales se colocan en un tubo de polipropileno de 200 μ l el cual contiene 10.5 μ l de agua y 12.5 μ l de master mix Qiagen, además de 50 pmol de cada primer se homogeniza y se coloca en un termociclador Veriti Applied Biosystems, con el siguiente programa 1 ciclo de 95°C-5 min, 35 ciclos de 95°C-1 min, 60°C-1 min y 72°C-1 min, 1 ciclo de 72°C-5 min. El producto de PCR se corre en un gel de agarosa al 3% con SyBr Green (Molecular probes), en TAE 1X a 90 volts por 60 min. Pasado el tiempo se observa en un analizador de imagen Gel Doc XR+ BIO-RAD.

Se valora la presencia o ausencia de bandas generalmente fragmentos con los siguientes tamaños: 100, 200, 300 400 y 600 pb, lo que es indicativo de una buena calidad de DNA para poder amplificar JAK-2.

Estandarización de PCR para evaluación de JAK2 Wild Type y Jak2 V617F

Se tomaron secuencias reportadas en la literatura, estas secuencias se les realizó un blast en el NCBI, secuencias que correspondieron al 100 % para cada tipo, se enviaron a IDT para generar los primers correspondientes.

Para estandarizar las condiciones de amplificación por PCR y tipicar la mutación JAK-2 V617F, se utilizaron controles positivos aquellas muestras que conocíamos el estado previo del gen JAK2 y control negativo se utilizaron las muestras de pacientes con LGC.

Una vez estandarizadas las condiciones de extracción y PCR se realizó el análisis de las muestras de pacientes seleccionados, el producto de amplificación se corre en un gel de agarosa al 3% con SyBR Green observando en el transiluminador la

presencia de un amplificado de 229 pb que corresponde al fenotipo WT y otro de 279 pb que corresponde al mutante; además un producto de 508 pb que corresponde al gen JAK2. Para confirmar la presencia de la mutación V617F se realiza una digestión del producto de 508 pb con la enzima Bsa XI, la cual se realiza incubando por 30 minutos a 37°C para observar si existe el corte se corre en un gel de agarosa al 2% observando un producto de 208 pb WT y 320 para MT.

Las muestras con buena calidad de ADN se preparan para realizar PCR tiempo real y verificar la presencia o ausencia de la mutación, para lo cual se utiliza 12.5 μ l de master mix sybr green, 10.5 μ l de agua y 50 pmol de cada primer en un tubo de 200 μ l y se coloca en un termociclador Applied Biosystem 7500 con el siguiente programa

Al término de la amplificación se realiza un barrido de temperatura para poder observar la presencia de picos que indican ausencia o presencia de la mutación (75°C). Los cuales se compararan con los controles negativo los cuales se observara la ausencia de dicho pico.

Para la cuantificación de citocinas utilizamos el ADN previamente obtenido y los primers reportados previamente para las siguientes citocinas, IL-4, IL-6, IL-12, IL-23, TNF α e IFN γ , con las siguientes condiciones de reacción 12.5 μ l de master mix, 10.5 μ l de agua y 50 pmol de cada primer se colocan en una placa de 96 pozos considerando 8 puntos de la curva estándar para cada citocina. La placa se coloca en un termociclador Applied Biosystem 7500 al finalizar la corrida se realiza un barrido de temperatura desde 45-90°C para verificar la presencia de un solo producto de amplificación para evaluar la presencia o ausencia de citocinas se

coloca un valor de corte con respecto a la curva estándar para cada citocina y se procede a analizar los datos obtenidos en cada corrida.

Resultados

De las 67 muestras iniciales al final solo se trabajaron 58 muestras para la obtención de datos histológicos y 67 para estudio de ADN; los cuales tenían buena cantidad de material biológico y que resultó después de la extracción de ADN con buena cantidad y calidad de este. De este material se tenía bloque y laminilla teñida con Hematoxilina-Eosina, este material se observó nuevamente para verificar el diagnóstico y hallazgos de la médula ósea. De donde se obtuvo la siguiente información:

Los hallazgos epidemiológicos de las muestras analizadas fueron los siguientes

Entidad	Edad media al diagnóstico (años)	Relación Hombre:Mujer
PV	63.3	4:7
TE	49.36	9:14
MF	58.1	6:5
LGC	37.06	9:7

Otra observación importante es el análisis de los cortes histológicos en médula ósea

Entidad	Espacios medulares promedio	Celularidad Promedio	Relación mieloide eritroide promedio	Megacariocitos promedio en 4 campos de gran aumento	Mielofibrosis Grado:Número de muestras
PV	15.77	83.88	2.47	29.4	0:4 I: 2 II: 2 NE: 3
TE	15.5	71.11	4.138	41.77	0: 9 I:6

					II:2 III:1 NE:5
MFP	21.42	70.71	4.85	32.85	0:1 I:1 II:1 III:4
LGC	14.68	89.37	6.06	21.68	0:12 I:2 II:1 III:1

En rojo se remarcan los valores más altos para cada una de las categorías estudiadas

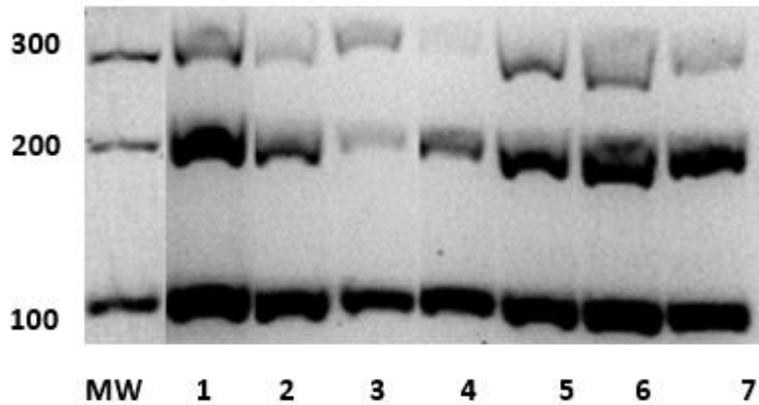
Otra observación son los hallazgos que se encontraron en la biometría hemática:

Entidad	Leucocitos	Plaquetas	Linfocitos	Monocitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos
PV	15.45	406.42	8.62	4.64	84.54	1.22	0.52
TE	4.48	708.6	25.39	6.06	65.60	1.84	0.89
MFP	22.9	296	15.81	7.3	58.51	6.63	2.43
LGC	8.38	228.64	28.72	6.60	59.10	2.15	1.97

La trombocitosis esencial tiene un mayor número de plaquetas en sangre periférica comparada con las demás.

Cuantificación y calidad del DNA:

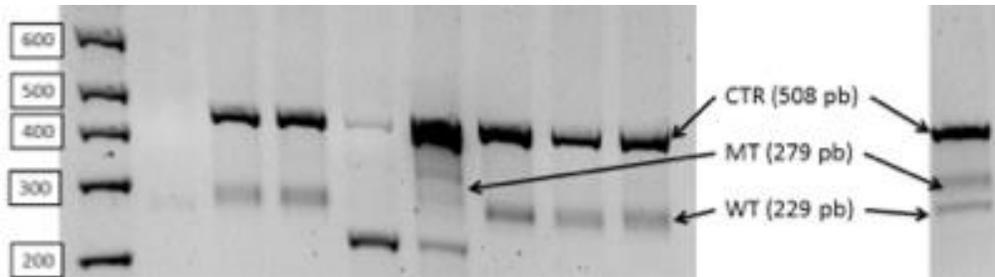
Las muestras para DNA se cuantificaron y se obtuvieron los siguientes resultados en promedio la cuantificación estuvo en 27.57 ng/ul, con una pureza de 0.64 y el promedio de amplificación fue de 300 Pb (gel)



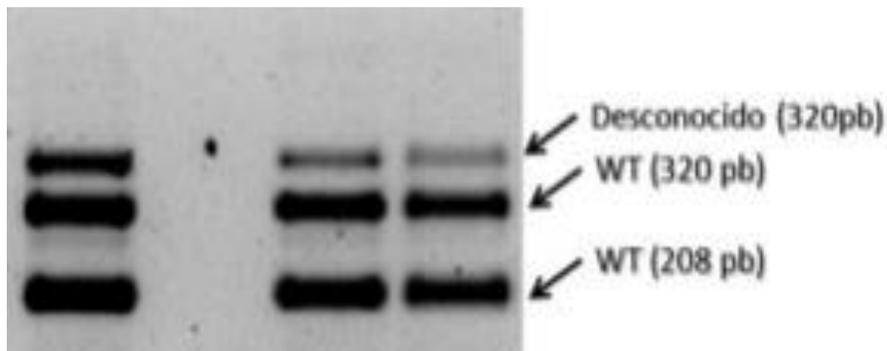
Evaluación de calidad de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 3%. Línea 1: marcador de peso molecular. Líneas 2-9 muestras de médula ósea FFPE. Donde se observan productos de amplificación de 100, 200 y 300 pb

Número de muestras	Pared de bases
43	300
20	200
3	100

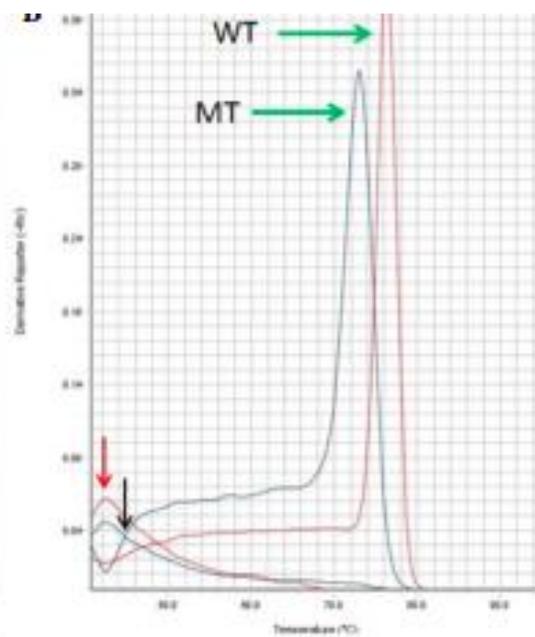
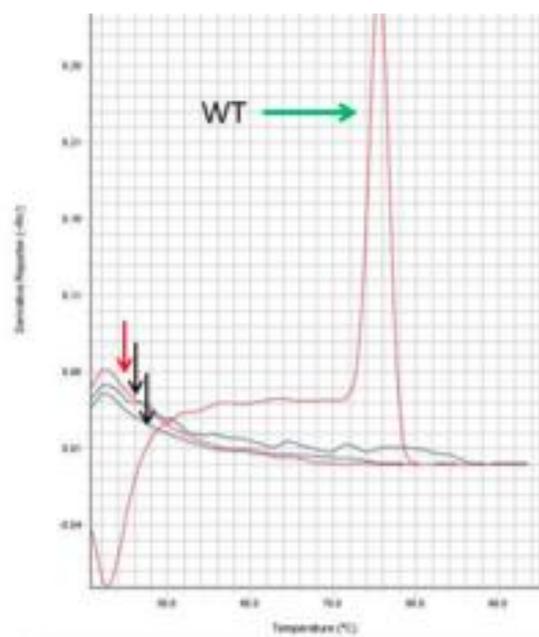
Una vez corroborada la calidad del ADN se procedio a correr el PCR para la amlificacion de la mutación JAK-2 V617F mediante PCR punto final, los productos se corren en un gel de agarosa al 3%, donde observamos la presencia de 3 productos de amplificación que corresponde al fenotipo Wild Type (229pb), para la mutación V617F el producto corresponde a 279pb y el gen de JAK amplificado de 508 pb.



Para corroborar la mutación JAK2 V617F se procede a realizar corte con enzima de restricción BsaXI del producto del gen JAK2 (508 pb), finalizado el tiempo de incubación el corte se evalúa en un gel de agarosa 2% y se observa la presencia de 3 producto uno de 508 que corresponde al gen JAK2 que no se corto, otro a después del corte a 320 (MT) y 208 (WT) corroborando los resultados obtenidos por PCR punto final.



Es importante conocer si el producto que se observa en el gel corresponde a un solo o son varios productos por lo que se realiza un melting de proteínas; en el caso de las proteínas Wild type solo se encontrata un pico; si se observan dos picos corresponderán a los tipos Wild type y mutacióm



DISCUSIÓN:

En la literatura mundial se ha observado que la policitemia vera es la neoplasia mieloproliferativa asociada a mutacion JAK2 v617F más frecuente; sin embargo, en nuestra serie su incidencia es menor a la de trombocitosis esencial. En los casos analizados la entidad que se presentó en un promedio de edad más bajo fue la leucemia granulocitica crónica; mientras que los pacientes mayores fueron aquellos con policitemia vera. En la presente serie se encuentra un ligero predominio en mujeres en aquellas neoplasias mieloproliferativas asociadas a mutaciones en JAK 2, mientras que la LGC tiene un ligero predominio en hombres.

Las muestras tomadas por el departamento de Hematología del hospital fueron mayoritariamente satisfactorias, encontrándose en todas las entidades un promedio mayor a 14 espacios medulares por muestra. Se encontró que los pacientes con una celularidad promedio más alta fueron aquellos con LGC, mientras que aquellos con una celularidad más baja fueron aquellos con mielofibrosis primaria (70%), e de notar la alta celularidad de los pacientes con mielofibrosis, ya que hay reportes de caso y en algunas series donde la celularidad se encuentra disminuida. Como se ha reportado en la literatura la relación serie granulocitica/serie eritroide se encuentra a favor de la serie granulocitica, siendo este diferencial mayor en la LGC (6 a 1 en promedio). Los pacientes con un mayor número de megacariocitos en 4 campos fueron aquellos con el diagnóstico de trombocitosis esencial, la mayor parte de las médulas analizadas tenían dismegacariopoyesis, con escasas formas normales y algunos de ellos se encontraban hiperlobulados. Este hallazgo en médula ósea se relaciona con el número de plaquetas halladas en sangre periférica, ya que los

pacientes con esta entidad también son los que tienen una mayor cantidad de plaquetas en circulación (708 mil en promedio).

Los pacientes con estadios más avanzados de mielofibrosis en médula ósea son aquellos con mielofibrosis primaria en esta serie, mientras que los que normalmente carecen de ella en biopsia son los pacientes con LGC. En los resultados de sangre periférica es de notar que los pacientes que tienen una mayor cantidad de neutrófilos en sangre periférica no fueron aquellos con LGC sino aquellos con PV. Muy probablemente estos hallazgos tengan que ver con los niveles medios de citocinas en el microambiente, como ya se ha mencionado en otros estudios.

Conclusiones

Las neoplasias mieloproliferativas son enfermedades poco frecuentes aún en centros de referencia

El estudio de las neoplasias mieloproliferativas requiere de hallazgos clínicos, morfológicos y genéticos.

La mielofibrosis y la cantidad media de megacariocitos varía dependiendo de la neoplasia

Los parametros en la biometría hemática también varían dependiendo de la neoplasia

La mutación JAK2 V617F se encuentra presente en los pacientes con neoplasias mieloproliferativas mexicanos

Se requiere el posterior estudio de las citocinas (llevandose a cabo a la escritura de esta tesis) para la caracterización completa del microambiente celular

Bibliografía:

1.- Akada, H., Akada, S., Hutchison, R.E., Sakamoto, K., Wagner, K.U. and Mohi, G. .Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2014; 32, 1878–1889

2.- Ghoreschi, K., Laurence, A. and O’Shea, J.J. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol. Rev.* 2009; 228, 273–287

3.- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365, 1054–1061

4.- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M. and Skoda, R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352, 1779–1790

5.- Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S. 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

8.- Harrison, C., Kiladjian, J.J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovskaya, V., McQuitty, M., Hunter, D.S., Levy, R., Knoops, L. et al. JAK

inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366, 787–798

9.- Varghese Leila, N., Ungureanu, D., Liao Nicholas, P.D., Young Samuel, N., Laktyushin, A., Hammaren, H., Lucet, I.S., Nicola, N.A., Silvennoinen, O., Babon, J.J. and Murphy, J.M. (2014) Mechanistic insights into activation and SOCS3-mediated inhibition of myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 mutants from biochemical and structural analyses. *Biochem. J.* 458, 395–405

10.- Musso T, Johnston JA, Linnekin D, Varesio L, Rowe TK, O'Shea JJ, McVicar DW. Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. *J Exp Med.* 1995; 181:1425–1431.

11.- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *The Journal of biological chemistry.* 2005; 280:22788–22792.

12.- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007; 356:459–468.

13.-Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Yeh C, Zhang ZJ, Verstovsek S, Albitar M. Mutation Profile of JAK2 Transcripts in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasias. *J Mol Diagn.* 2010; 11:49–53.

14.- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005; 434(7037):1144-1148.

15.- Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, et al. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS ONE.* 2006;1e18.

16.- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998; 93: 385–395.

17.- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107: 4274–4281

18.- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumor micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013; 501:346-354.

19.- Ma X, Vanasse G, Cartmel B, Wang Y, Selinger HA. Prevalence of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2008; 83:359-362.

20.- Kobayashi SS, Vali S, Kumar A, Singh N, Abbasi T, Sayeski PP. Identification of myeloproliferative neoplasm drug agents via predictive simulation modeling: assessing responsiveness with micro-environment derived cytokines. *Oncotarget.* 2016 Jun 14;7(24):35989-36001

21.- Thiele J. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;156:1128-32.

22.- Akiyama T, Matsunaga T, Terui T, et al. Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. *Leukemia* 2005;19:1558-66.

23.- Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F, Pancrazzi A, Torre E, Nishikawa M. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood* 2005;105:3493-551.

24.- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA: JAK/ STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCRABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189–218

25.- Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y: Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004; 202: 275– 293.

26.- Ruiz-Argüelles Guillermo J., Garcés-Eisele Javier, Reyes-Núñez Virginia, J. Ruiz-Delgado Guillermo, Navarro-Vázquez Morelis, González-Carrillo Martha L.. The Janus Kinase 2 (JAK2) V617F mutation in hematological malignancies in México. *Rev. invest. clín.* . 2006 Oct ; 58(5): 458-461

27.- Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu S.N, Bernard O. A. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011 118: 1723-1735

28.- Vainchenker W, Constantinescu S. N. A unique Activating Mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia Vera and allows a new Classification of myeloproliferative diseases. *American Society Hematology*. 2005. 195-200.

29.- Tefferi A, Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point of care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22, 14- 22.

30.- Velarde F. J. S, Rivas L. R, Zazueta M. L, Ochoa R. L. R, Ríos T. J. J, Rendón A. H. Coexistencia de las mutaciones V617F del gen JAK-2 y G20210A del gen de la protrombina en una paciente con trombocitemia esencial. *Rev. Mex Patol Clin*, 2008; Vol. 55, Núm. 3, pp 139-142.

31.- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. . The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*,2016; 127(20), 2391-2405.