

**INFLUÈNCIA DE L'HAPLOTIP 46/1 DEL GEN *JAK2* EN LA  
VARIACIÓ DE LA CÀRREGA AL·LÈLICA DE LA MUTACIÓ  
*JAK2V617F* EN PACIENTS AMB POLICITÈMIA VERA I  
TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL**

**Autora: ANNA ANGONA FIGUERAS**

Treball de Recerca. Doctorat de Medicina, Juny 2011.

Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina.

Director del treball: **Dr. Besses Raebel**

Cap d'Hematologia Clínica de l'Hospital del Mar.

Director de la línia de Recerca en *Neoplàsies Mieloproliferatives Cròniques*

## **CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA**

Dr. **Carles Besses i Raebel**, Cap del Servei d'Hematologia Clínica de l'Hospital del Mar i Director de la línia de Recerca en *Neoplàsies Mieloproliferatives Cròniques* del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

FA CONSTAR,

que el treball titulat **INFLUÈNCIA DE L'HAPLOTIP 46/1 DEL GEN JAK2 EN LA VARIACIÓ DE LA CÀRREGA AL·LÈLICA DE LA MUTACIÓ JAK2V617F EN PACIENTS AMB POLICITÈMIA VERA I TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL**, ha estat realitzat sota la meua direcció per la llicenciada **Anna Angona i Figueras**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de juny.

Barcelona, vint-i-quatre de Maig de dos mil onze.

## **ÍNDEX**

Resum	p. 4
Introducció	p. 5
Material i mètodes	p. 6
Resultats i discussió	p. 8
Conclusions	p. 12
Bibliografia	p. 13
Annexes	p. 16

## RESUM

La presència de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* predisposa a neoplàsies mieloproliferatives associades a la mutació de *JAK2V617F*, però la seva rellevància clínica és desconeguda. La càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* es va determinar de forma retrospectiva en 62 pacients amb policitemia vera (PV, n=26) o trombocitèmia essencial (TE, n=36) que no havien rebut tractament citoreductor. Els pacients amb PV i haplotip 46/1 en forma homozigota presentaven una càrrega al·lèlica mitjana, tant en el moment del diagnòstic com a l'últim control, significativament superior respecte els que presentaven l'haplotip 46/1 heterozigot o negatiu. La mitjana d'augment de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* des del diagnòstic fins a l'última mostra era del 4%, 6% i del 23% en els pacient amb PV amb haplotip 46/1 negatiu, heterozigot i homozigot, respectivament (p=0.001). En els pacients amb TE, la presència de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* no tenia influència en la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F*. En resum, els pacient amb PV que no han rebut tractament i que presenten l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma homozigota presenten un augment progressiu de la càrrega al·lèlica.

**Paraules clau:** *JAK2V617F*, haplotip 46/1 del gen *JAK2*, càrrega al·lèlica, policitemia vera, trombocitèmia essencial.

## INTRODUCCIÓ

Durant els darrers anys han aparegut diversos treballs en els quals s'investiga l'associació entre la mutació *JAK2V617F* i diferents polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNP) localitzats en el mateix locus del gen *JAK2*. El conjunt d'SNP localitzats en un mateix al·lel que es troben estadísticament associats es coneix amb el nom d'haplotip. S'han descrit nou haplotips pel que fa al gen *JAK2*, designats amb els números 1, 8, 32, 38, 46, 55, 71, 76 i 88.

La policitèmia vera (PV) i la trombocitèmia essencial (TE) són neoplàsies mieloproliferatives (NMP) caracteritzades per fenòmens trombòtics i hemorràgics durant la seva evolució clínica (1). La presència de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* predisposa al desenvolupament de NMP associades a *JAK2V617F*, però la seva rellevància clínica posterior al diagnòstic és desconeguda (2-4).

Una càrrega al·lèlica elevada de *JAK2V617F* ha estat relacionada amb una alta freqüència de complicacions trombòtiques i de transformació a mielofibrosi en els pacients amb PV (5-6), així com amb un curs clínic més agressiu en els pacient amb TE (7). Aquests fets posen de manifest la importància de la monitorització molecular en el maneig dels pacients amb NMP *JAK2* positives. No obstant, es desconeixen els factors clínics i/o biològics associats amb la modulació de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* durant l'evolució de la PV o de la TE. L'objectiu d'aquest treball va ser determinar la influència de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en l'evolució natural de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en pacients diagnosticats de NMP *JAK2* positives que no havien rebut tractament citoreductor.

## MATERIAL I MÈTODES

Es van incloure a l'estudi un total de 62 pacients diagnosticats de forma consecutiva de NMP associades a *JAK2V617F* (26 PV i 36 TE) al Departament d'Hematologia de l'Hospital del Mar. El diagnòstic es va realitzar d'acord amb els criteris de l'Organització Mundial de la Salut del 2008 (8). L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic del Centre i es va obtenir el consentiment informat de cada pacient segons la Declaració de Helsinki.

Aquest grup de pacients no van rebre, durant el període d'estudi, cap tipus de tractament citoreductor. Així, els pacients amb PV van rebre tractament amb flebotomies i tractament antiagregant i els pacients amb TE, tractament antiagregant o observació. La monitorització molecular de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* es va determinar en el moment del diagnòstic i posteriorment cada 6-12 mesos. L'anàlisi de *JAK2V617F* es va realitzar per duplicat en l'ADN complementari (ADNc) obtingut de granulòcits purificats mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) al·lèl-específica. Per la determinació de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* es van utilitzar els SNPs (*single nucleotide polymorfism*) rs12340895 i rs12343867. En aquells pacients que presentaven l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma homozigota, també es va analitzar l'ADNc germinal obtingut a partir de saliva (n=8) o de cèl·lules T (n=3).

La càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* al diagnòstic i durant el seguiment es va analitzar en relació a l'estat de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* (negatiu, heterozigot o homozigot). La diferència de càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* entre la mostra del diagnòstic i les mostres posteriors de cada pacient es va determinar segons aquesta fórmula:

Variació de *JAK2V617F* = (% última *JAK2V617F* - % *JAK2V617F* al diagnòstic).

Les variables categòriques es van expressar amb freqüències i percentatges i les variables contínues amb mitjanes i intervals de confiança (IC) del 95% o amb medianes i rangs. Les diferències entre els grups es van analitzar amb ANOVA i posterior anàlisi post-hoc amb el test de Student-Newman-Keuls. Es va considerar significatiu a partir de valors de  $p < 0.05$ . Per l'anàlisi estadístic es va utilitzar el programa SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL).

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les principals característiques clíniques i biològiques dels pacients es mostren a la taula 1. Com s'esperava, la mitjana del percentatge d'al·lels amb *JAK2V617F* va ser significativament superior en els pacients amb PV respecte els pacients amb TE, tant en el moment del diagnòstic com en el darrer control del seguiment. No obstant, no es van objectivar diferències significatives en la mitjana d'augment de la càrrega al·lèlica respecte el diagnòstic de PV o TE (taula 1). Es van observar 20 casos negatius (13 TE, 7 PV) i 42 positius (23 TE, 19 PV) per l'haplotip 46/1 del gen de *JAK2*, dels quals 29 pacients (62%) presentaven l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma heterozigota (TE n=16, PV n=13) i 13 (31%) en forma homozigota (TE n=7, PV n=6) (taula 2). Aquestes dades són similars a les reportades prèviament en altres treballs. L'homozigosi o heterozigosi de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* no presentava diferències significatives d'acord amb l'edat, sexe, tipus de diagnòstic (PV o TE) i valors hematològics basals.

En 11 dels 13 pacients que presentaven l'haplotip 46/1 en forma homozigota es disposava d'ADN germinal. Un d'aquests 11 pacients presentava l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma heterozigota a l'ADN germinal, suggerint que l'homozigosi de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* observada a l'ADN dels granulòcits era resultat d'una recombinació mitòtica. Els 10 pacients restants presentaven resultats concordants entre l'ADN germinal i l'ADN obtingut dels granulòcits, confirmant que l'homozigosi per l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* es tractava d'una característica constitucional.

A la taula 3 es mostren les mitjanes de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* al diagnòstic i durant el seguiment segons la presència o absència



de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2*. La presència de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* es va associar amb un efecte dosi a la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* com demostra el fet que els pacients amb major càrrega al·lèlica corresponien als que presentaven l'haplotip 46/1 en forma homozigota i, per contra, els pacients amb menys càrrega al·lèlica amb als que no el presentaven. Els pacients heterozigots van presentar valors intermitjos. Quan l'anàlisi es va realitzar segons el diagnòstic, els pacients amb PV i haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma homozigota van presentar una càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* significativament més alta que els pacients amb PV i negativitat o heterozigosi per haplotip 46/1 del gen *JAK2* (taula 3). No s'observaren diferències significatives en la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en els pacients amb TE segons l'estat de l'haplotip 46/1 (taula 3).

Amb l'objectiu d'estudiar si la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* es manté estable o presenta un augment progressiu durant l'evolució de la malaltia, es va calcular en cada pacient la diferència de de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* observada en el moment del diagnòstic i en l'última mostra del seguiment. Amb una mitjana de seguiment de 50 mesos (19-92), la càrrega al·lèlica es va mantenir estable en 44 pacients, mentre que 18 (30%) pacients presentaven un augment de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* superior al 10%. La mitjana de l'augment de la càrrega al·lèlica des del diagnòstic fins a l'última determinació va ser del 4%, 6% i 15% en els pacients negatius, heterozigots i homozigots per l'haplotip 46/1 del gen *JAK2*, respectivament ( $p=0.02$ ). No hi havia diferències significatives de la mitjana d'augment de la càrrega al·lèlica d'acord amb edat i sexe. L'efecte de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en la mitjana de l'augment de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* també es va estudiar segons el

diagnòstic de NMP. Així, l'homozigosi per l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* es va associar amb augment significatiu de la càrrega al·lèlica durant l'evolució de la malaltia en pacients amb PV, però no amb TE (taula 3). Aquests resultats suggereixen que l'haplotip 46/1 influeix a l'evolució natural de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en els pacients amb PV. Diversos estudis han explicat l'evolució de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en pacients tractats i no tractats amb NMP associades a *JAK2V617F* amb resultats contradictoris (9-13). Aquesta característica pot reflectir diferències en la selecció de pacients i en els criteris de resposta utilitzats. En aquest sentit, i tal i com hem demostrat en el present estudi, l'evolució de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* és heterogènia en els pacients amb TE, independentment de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2*. Per contra, una proporció de pacients amb PV, principalment els que presenten l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma homozigota, presenten un augment progressiu de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F*. Ja que aquest estudi inclou una cohort de pacients prospectiva amb NMP amb *JAK2V617F* sense tractament, les troballes prèviament comentades indiquen que l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* pot ser un dels factors que influeixin en l'evolució de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en la PV.

Tenint en compte que els pacients amb una càrrega al·lèlica més elevada de *JAK2V617F* presenten un risc superior de complicacions trombòtiques i transformació a mielofibrosi, seria interessant identificar aquests pacients que mostren un augment progressiu de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F*. En aquest sentit, l'estat de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* podria ser útil. No obstant, són necessaris estudis amb més pacients i amb un seguiment més llarg per tal de confirmar si l'estat de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* és un

factor de risc per l'aparició de complicacions trombòtiques i/o transformació a mielofibrosi en les NMP *JAK2* positives.

## CONCLUSIÓ

El present estudi mostra que els pacients amb PV que no reben tractament citoreductor i que presenten l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en forma homozigota presenten un augment progressiu de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F*, a diferència dels pacients amb TE. Aquesta dada suggereix que l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* és un dels factors que modulen la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en els pacients amb PV.

## BIBLIOGRAFIA

1. Finazzi G, Barbui T Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia*, 2008; 22: 1494-1502.
2. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, Bass A, Marubayashi S, Heguy A, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Offit K, Stone RM, Gilliland DG, Klein RJ, Levine RL. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41(4): 455-9.
3. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41(4): 446-9.
4. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. *Nat Genet* 2009; 41(4): 450-4.
5. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 (V617F) allele burden. *Leukemia* 2007; 21: 1952-1959.

6. Álvarez-Larran A, Bellosillo B, Martínez-Aviles L, Saumell S, Salar A, Abella E, Gimeno E, Serrano S, Florensa L, Sanchez B, Pedro C, Besses C. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol* 2009; 146: 504-509.
7. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De S, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*, 2007; 10: 840-846.
8. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002; 100: 2292-2302.
9. Besses C, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Mojal S, Longarón R, Salar A, Florensa L, Serrano S, Bellosillo B. Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol*, 2011; 152(4): 413-9.
10. Antonioli E, Carobbio A, Pieri L, Pancrazzi A, Guglielmelli P, Delaini F, Ponziani V, Bartalucci N, Tozzi L, Bosi A, Rambaldi A, Barbui T, Vannucchi A. Hydroxyurea does not appreciably reduce JAK2 V617F allele burden in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, 2010; 95(8): 1435-8.

11. Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Santos FD, Vidal A, Maynadie M, Hermouet S. Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. *Haematologica*, 2008; 93: 1723-1727.
12. Theoharides A, Passweg JR, Medinger M, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Buser AS, Gratwohl A, Tichelli A, Skoda RC. The allele burden of JAK2 mutations remains stable over several years in patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 2008; 93: 1890-1893.
13. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*, 2008; 22: 1299-1307.

## ANNEXES

**Taula 1.** Característiques clíniques i biològiques de 62 pacients amb NMP associades a *JAK2V617F*.

	Total de pacients n = 62	Pacients amb PV n = 26	Pacients amb TE n = 36	p
Edat, anys	48 (20-78)	52 (20-67)	46 (30-78)	ns
Sexe, m/f	26/36	16/10	10/26	0.01
Hematòcrit, L/L	45 (39-65)	50 (43-65)	44 (39-53)	< 0.001
Leucòcits, $\times 10^9/L$	8.5 (5.4-18.2)	9.5 (5.5-18.2)	8.2 (5.4-12.8)	< 0.001
Plaquetes, $\times 10^9/L$	596 (229-1347)	589 (229-1347)	612 (458-992)	ns
JAK2V617 basal, %	31 (3-83)	37 (9-83)	26 (3-38)	< 0.001
Últim JAK2V617F, %	32 (3-100)	43 (9-100)	28 (3-94)	0.001
Augment JAK2V617F, %	3 (0-58)	4 (0-42)	3 (0-56)	ns

PV: Policitemia vera; TE: trombocitemia essencial; m: masculí; f: femení. Les variables continues s'expressen com a mitjanes (rangs de valors) i les variables categòriques com a nombre de pacients.



**Taula 2.** Estat de l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en 62 pacients amb NMP associades a *JAK2V617F*.

	Total de pacients n = 62	Pacients amb PV n = 26	Pacients amb TE n = 36	p
Negatiu, n (%)	20 (32)	7 (27)	13 (36)	ns
Positiu heterozigot, n (%)	29 (46)	13 (50)	16 (44)	ns
Positiu homozigot, n (%)	13 (21)	6 (23)	7 (19)	ns

PV: Policitemia vera; TE: trombocitemia essencial

**Taula 3.** Càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* segons l'haplotip 46/1 del gen *JAK2* en els 62 pacients amb NMP associades a *JAK2V617F* que no han rebut tractament citoreductor.

	Haplotip 46/1 del gen <i>JAK2</i>			p
	Negatiu	Heterozigot	Homozigot	
<b>Tots els pacients</b>	n=20	n=29	n=13	
JAK2V617F basal, %	27 (22-32)	34 (28-40)	41 (26-55)	0.06
Última JAK2V617F, %	30 (24-36)	38 (29-47)	55 (35-75)*	0.01
Augment JAK2V617F, %	4 (2-7)	6 (2-11)	15 (7-22)*	0.02
<b>Pacients amb PV</b>	n=7	n=13	n=6	
JAK2V617F basal, %	31 (21-40)	44 (33-54)	62 (41-82)*	0.01
Última JAK2V617F, %	34 (23-46)	46 (32-60)	85 (61-100)*	0.001
Augment JAK2V617F, %	4 (1-8)	6 (1-8)	23 (11-36)*	0.001
<b>Pacients amb TE</b>	n=13	n=16	n=7	
JAK2V617F basal, %	25 (18-31)	25 (21-31)	23 (16-30)	0.8
Última JAK2V617F, %	28 (21-36)	30 (19-42)	29 (21-38)	0.9
Augment JAK2V617F, %	4 (2-7)	7 (0-14)	7 (0-15)	0.8

\*  $p < 0.005$  quan es compara amb el grup de pacients amb haplotip 46/1 negatius i heterozigots. PV: Policitemia vera; TE: trombocitemia essencial. Els valors s'expressen com a mitjanes amb un interval de confiança del 95% analitzat amb ANOVA i posterior anàlisi post-hoc amb el test de Student-Newman-Keuls